

MTA Doktori értekezés

**Egyes gazdasági haszonhalaink hímivartermékeinek
mélyhűtése, a technológia standardizálásának
kidolgozása és gyakorlati alkalmazása**

Dr. Urbányi Béla

Gödöllő

2011

dc_273_11

***Hiú ember. S mert korlátolt szemed
Zilált csoportot lát csak odalent,
Már azt hiszed, nincs összeműködés,
Nincs rendszer az életnek műhelyében?***

(Madách: Az ember tragédiája, Londoni szín)

Emlékül Édesapámnak, aki megtanított a halászat szeretetére és becsületére.



TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	11
2.1. <i>Az ivarsejt mélyhűtés, mint kutatási terület</i>	11
2.2. <i>A mélyhűtés alapelvei</i>	12
2.2.1. A víz és vizes oldatok fagyása.....	12
2.2.2. Az élő sejtekben és szövetekben végbementő folyamatok	13
2.2.3. A védőanyagok.....	14
2.2.4. A mélyhűtött sejtek tárolása.....	15
2.3. <i>A halak hím ivarszervei és ivarsejtjei</i>	15
2.3.1. A here típusai	15
2.3.2. A here szerkezete.....	16
2.3.3. A halak spermiuma.....	17
2.3.4. A spermatogenezis folyamata	19
2.4. <i>A halsperma-mélyhűtés folyamata</i>	20
2.4.1. A spermamélyhűtés története.....	20
2.4.2. A sperma kinyerése.....	21
2.4.3. A natív sperma minősítése	21
2.4.4. A sperma hígítása a hűtőmediummal	23
2.4.5. Az egyensúly	24
2.4.6. A sperma hűtése	24
2.4.7. A tárolás	26
2.4.8. A felolvasztás	26
2.4.9. Termékenyítés felolvasztott spermával	26
2.5. <i>A spermamélyhűtés gyakorlati alkalmazása</i>	27
2.5.1. A spermamélyhűtés standardizálásának lehetőségei.....	27
2.5.2. Spermamélyhűtés alkalmazása a halgazdálkodásban	29
2.5.3. Mélyhűtésből származó ivadék életképesség vizsgálatának eddigi eredményei.....	31
2.6. <i>A halsperma mélyhűtés eddigi eredményei és problémái rendszertani csoportok szerint.....</i>	33
2.6.1. Tokfélék.....	34
2.6.2. Pontyfélék.....	35
2.6.3. Harcsaalakúak.....	36
2.6.4. Sügéalakúak.....	42
3. Eredmények tárgyalása	45
3.1. <i>A kísérleti munkák általános áttekintése és a folyamatok standardizációja ...</i>	45
3.1.1. Általános információk	45
3.1.2. Standardizálási vizsgálatok	45
3.2. <i>Kísérleti munka és eredmények bemutatása ponty fajon</i>	47
3.2.1. Bevezetés, a munka indokoltsága	47
3.2.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása	47
3.2.3. Az egyedek oltása	47
3.2.4. A tejesek fejése	48
3.2.5. Az ikrások fejése	49
3.2.6. A sperma mélyhűtése.....	49
3.2.7. A mélyhűtött spermával végzett termékenyítés	50
3.2.8. Az eredmények statisztikai feldolgozása	50
3.2.9. A kísérletek eredményei	51

3.2.10. Következtetések	53
3.2.11. Javaslatok.....	55
3.3. <i>Kísérleti munka és eredmények bemutatása pontyféléken</i>	56
3.3.1. Bevezetés, a munka indokoltsága	56
3.3.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása	56
3.3.3. Az oltás.....	57
3.3.4. Az ikrások fejése	58
3.3.5. A tejeselek fejése	58
3.3.6. A spermamélyhűtés folyamata	58
3.3.7. Termékenyítés.....	59
3.3.8. Az adatok statisztikai feldolgozása	59
3.3.9. A kísérletek eredményei	60
3.3.10. Következtetések	63
3.3.11. Javaslatok.....	64
3.4. <i>Kísérleti munka és eredmények bemutatása harcsa fajon</i>	65
3.4.1. Bevezetés.....	65
3.4.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása	65
3.4.3. A hím egyedek tartása és kezelése	65
3.4.4. A hím ivartermék gyűjtésének, eltarthatóságának módszere	66
3.4.5. A mélyhűtés módszertana	67
3.4.6. A hűtési idő, hűtési sebesség és az sperma-ikra arány mélyhűtést befolyásoló hatásainak vizsgálata	68
3.4.7. A termékenyítési kísérletek bemutatása és a módszer alkalmazhatóságának vizsgálata keltetőházi (üzemi) körülmények között	69
3.4.8. Alkalmazott statisztikai módszerek	70
3.4.9. Eredmények	70
3.4.10. Következtetések	76
3.4.11. Javaslatok.....	79
3.5. <i>Kísérleti munka és eredmények bemutatása süllő fajon</i>	80
3.5.1. Bevezetés.....	80
3.5.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása	80
3.5.3. A halak tartása és kezelése.....	80
3.5.4. A sperma vizsgálata	81
3.5.5. A spermamélyhűtés menete	81
3.5.6. Termékenyítés mélyhűtött spermával.....	82
3.5.7. Mélyhűtött süllősperma alkalmazhatóságának vizsgálata keltetőházi (üzemi) körülmények között.....	82
3.5.8. Alkalmazott statisztikai módszerek	83
3.5.9. Eredmények	84
3.5.10. Következtetések	86
3.5.11. Javaslatok.....	87
3.6. <i>Kísérleti munka és eredmények bemutatása kecsege fajon</i>	88
3.6.1. Bevezetés.....	88
3.6.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása	88
3.6.3. Az ivartermékek elvétele	89
3.6.4. A mélyhűtés menete.....	89
3.6.5. Termékenyítés mélyhűtött spermával.....	90
3.6.6. Az adatok statisztikai feldolgozása	90
3.6.7. Eredmények	90
3.6.8. Következtetések	93

3.6.9. Javaslatok.....	94
3.7. <i>A standardizálás lehetőségeinek vizsgálata a kapott eredmények alapján</i>	95
3.7.1. Bevezetés.....	95
3.7.2. A mélyhűtés teljesítmény fokozásának szükséges kritériumai	95
3.7.3. A hal ivarsejtmélyhűtés fejlődési lehetőségei	96
4. Új tudományos eredmények.....	100
5. Összefoglalás.....	101
6. Irodalomjegyzék.....	103
7. Köszönetnyilvánítás	118

1. Bevezetés

Az ivarsejt mélyhűtés, mint biotechnikai-biotechnológiai módszer több mint **60 éve ismert a tudomány és az emberiség számára**. Létjogosultsága az agrárium egyes ágazataiban megkérdőjelezhetetlen, viszont elmondható, hogy napi szinten alkalmazható rutin módszerként csak néhány mezőgazdasági (állattenyésztési) szektorban kerül alkalmazásra.

A halászati termelő ágazatban, valamint a halászati kutatásban is megelhető ez a módszer, de napjainkban jóval csekélyebb mértékben alkalmazzák a gyakorlatban, mint amire a benne rejlő lehetőségek predesztinálnák. Ennek okait és miértjeit nem tiszte ennek a dolgozatnak elemezni, de néhány olyan tényeken alapuló előrejelzést fontos kiemelni, mely várhatóan a jövőben ezen eljárás fontosságát emelni fogja a halászat és akvakultúra területén egyaránt.

Az emberiség lélekszáma évente 80 millióval növekszik, most 6,6 milliárd, de 2050-re meghaladja majd a 9 milliárdot (U.S. Census Bureau, 2009). Ez a hatalmas embertömeg (többek között) egy-egy alapvető input és output kritériummal rendelkezik: élelemmel kell ellátni, és munkája/tevékenysége folytán terheli (gyakorta) szennyezi a környezetét. Ezen tények alapjaiban határozzák meg a mezőgazdaság hangsúlyos voltát: ezt az embertömeget nap, mint nap élelmiszerrel, élelmiszer alapanyaggal kell ellátni, viszont a mezőgazdasági területek a nagy embertömeg közvetett vagy közvetlen hatására szennyeződnek, szűkülnek, adottságaik romlanak.

A folyamatos termelésnövelési kényszer, a termelés intenzifikálása alapvetően rákényszeríti a mezőgazdaságot és az ipart, hogy a **legfejlettebb technológiát, a tudomány legújabb vívmányait is alkalmazza**. Emellett a folyamatos nyersanyagigény eredőjeként újabb és újabb területek kerülnek mezőgazdasági művelés és ipari hasznosítás alá, ami környezetvédelmi- és természetvédelmi aggályokat ébreszt és generál. Ezt támasztja alá az a tény, hogy a világon napjainkig 6 379 állatfajt házasítottak, melyek közül 9% állománynagysága kritikus értéken van, és 39%-a már veszélyeztetett státuszban van (Hiemstra et al., 2005).

A halak osztályának fajgazdagsága a legnagyobb a gerincesek törzsében, több mint 22 000 halfajt ismerünk. Ennek 58%-a tengeri, 41%-a édesvízi halfaj, és 1%-a az édesvízi és sósvízi térség között vándorol élete során. A legváltozatosabb halfajok a tengerekben alakultak ki, ami nem véletlen, mivel a Föld 70%-át borítja sósvízű tenger és/vagy óceán. A Föld édesvízi borítottsága csak 1%, viszont ez a kis terület 8 000 halfaj otthona és élettere.

A világ halászati termelése 974 halfajt, 143 rákfélét 116 puhatestűt, 26 növényfajt és 73 egyéb állatfajt (pl. tüskésbőrűeket) érint. Ezek közül 153 halfaj, 60 héjas állat, 44 puhatestű, 11 növény és néhány egyéb állat jelenti a tényleges termelés döntő hányadát (Bartley, 2005).

A **FAO** (Food and Agriculture Organization) felmérte a vízi szervezetek genetikai tartalékainak védelmi és megőrzési lehetőségeit. A tanulmány hangsúlyozza, hogy mind a termelés fokozása, mind pedig a biológiai és genetikai sokszínűség megőrzése elképzelhetetlen a modern biotechnológiai és biotechnikai eljárások alkalmazása nélkül (Bartley és Pullin, 1999).

A fentiek alapján bátran kijelenthető, hogy a termelés fokozásának egyik módszere lehet az ivarsejt mélyhűtése a halaknál is, valamint az is belátható, hogy a környezet állapotának drasztikus rombolása, a biodiverzitás rohamos csökkenése,

ezen hatások kiküszöbölése és megelőzése szintén **az ivarsejt mélyhűtés valós szükségességét vetíti előre.**

A természeti erőforrások egyre gyorsabb ütemű felélése, az élőhelyek elpusztítása miatt napjainkban sokkal nagyobb a fajkihalás üteme, mint bármikor a Föld története során. A leglátványosabban ez a gerinces állatok esetében figyelhető meg: jelenleg a madarak 11, az emlősök 25 és a **halak 34%-a vált veszélyeztetetté.** Megszülettek azok a kezdeményezések, amelyek lényege a fajkonzerváció, vagy általánosabban: a biológiai változatosság, azaz biodiverzitás megőrzése.

Az elmúlt évszázadban 270 halfaj pusztult ki a Földön, és a kipusztulás és fenyegetettség gyorsulását jól jelző adat, hogy a 270 halfajból 160 halfaj 1964 után, az ipari és mezőgazdasági termelés növekedésének fokozódásától számítható. Összességében elmondható, hogy az édesvízi halfajok 20%-a, míg a tengeri halfajok 39%-a veszélyeztetett kategóriába sorolható, habár ennek a státusznak az értelmezése, és a státuszt megillető védelem bizonyos érdekek következtében nem mindig biztosítja a halfajok megóvását (Helfman, 2007).

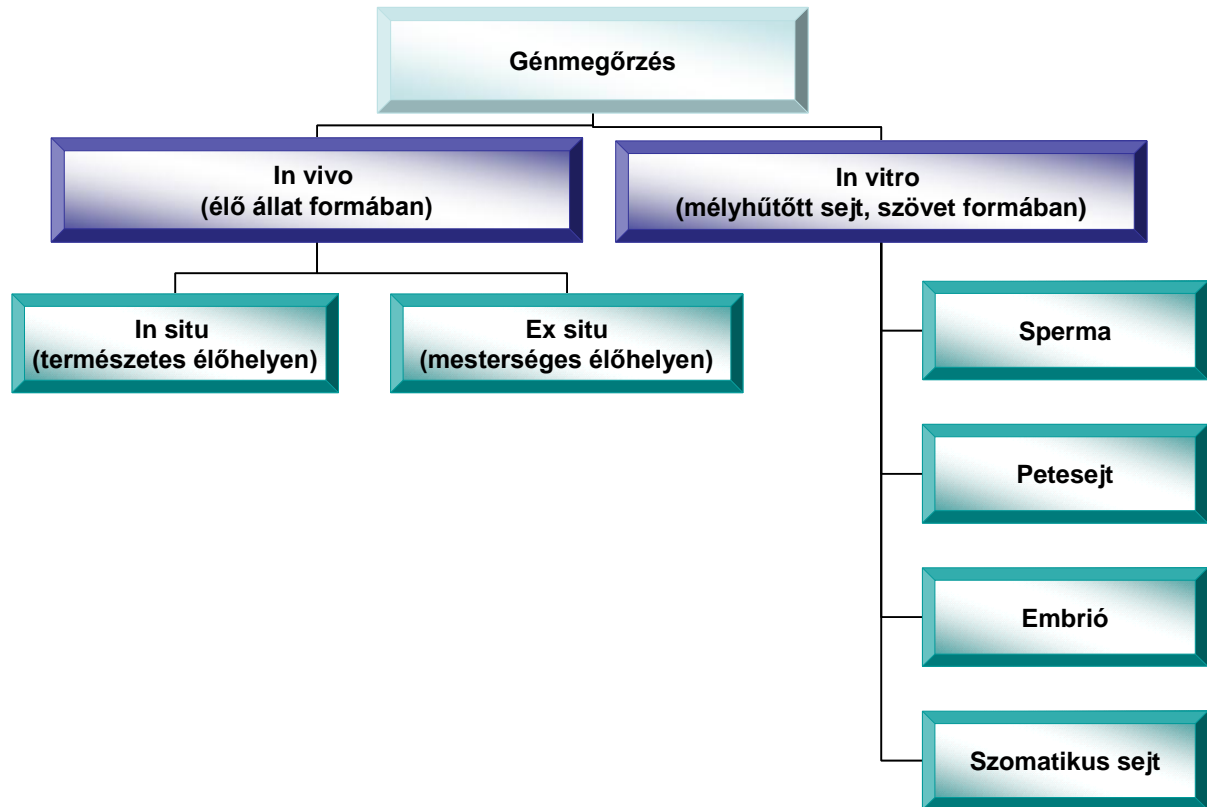
A halfajok jelentősége az alábbiakban foglalhatóak össze (teljesség igénye nélkül):

- A halak a táplálkozási lánc (táplálék piramis) fontos szereplői, az ökológiai egyensúly fontos tagjai: egyesek más halfajok vagy magasabbrendű ragadozó állatok táplálékai, valamint egyes vízi szervezetek egyensúlyának őrei;
- Fontos indikátorai a vízminőségnek és az ökoszisztéma egyensúlynak: egyes halfajok eltűnése bizonyos vizekből jelzi a vízminőség romlását. Emellett további tevékenységek (eliszapolódás, vízszennyezés, vízierőművek, bányászat, túlhalászat stb.) is negatív hatással vannak a halak elterjedésére. Röviden fogalmazva: a halak a vizek őrszemei-indikátorai, azonnal jelzik, ha változás van a környezetükben;
- A vadon élő és a tenyésztett halfajok fontos elemei az emberi táplálkozásnak. A halhús magas fehérje tartalma, kiváló zsírsav összetétele, zsír- és koleszterinszegény volta következtében egyike a legegészségesebb élelmiszereknek. Rendszeres fogyasztása pozitív hatással van az egyének egészségi és fitnesz állapotára. Néhány haltermék ínycsemege, melyek a luxus élelmiszer kategóriájába tartoznak (kaviár);
- A horgászat, mint szabadidős tevékenység jelentős társadalomra gyakorolt hatással rendelkezik. Iparágak élnek meg a horgász társadalom kiszolgálásából (felszerelések, csali eledelek gyártása stb.), és óriási tömegek választják időtöltés végett a horgászatot. Hazánkban 300.000 főre tehető a horgászok létszáma, de pl. az Amerikai Egyesült Államok lakosságának 30%-a rekreációs horgásznak számít.

A tenyésztett és vadon élő állatok biodiverzitásának megőrzését hívatott koordinálni a számos állam vezetője által ratifikált **Biológiai Diverzitás Egyezmény** (CBD, 1992). Az ebben megfogalmazott elvek mentén született tanulmányok és szakkönyvek taglalják az egyes állatosztályok-fajok megőrzésének módjait, megvilágítva azok előnyeit és hátrányait egyaránt. A szakirodalom azonban egységes véleményen van az ivarsejt mélyhűtés potenciális hasznosíthatósága és alkalmazhatósága terén: a közeljövő fontos feladatának jelölik meg a mélyhűtési technológiák fejlesztési és kidolgozási ütemének gyorsítását, mely technológiák

felhasználása a tenyésztés és génmegőrzés két fontos területén kerülhet legelőször bevezetésre (Hill, 2005).

A **modern génmegőrzési eljárásokat** többféle módon lehetséges osztályozni, melyek közül a legfontosabbat mutatja be az 1. sz. ábra.



1. sz. ábra: A gazdasági haszonállatok génállomány megőrzésének alap módozatai (Simianer, 2005)

A halak spermájának mélyhűtése az '50-es években kezdődött, de az azóta eltelt több mint fél évszázad alatt sem nyert létjogosultságot a gyakorlati életben. Természetesen vannak kivételek, a lazacfélék egyes fajainál (Amerikai Egyesült Államok), illetve tokfélék egyes fajainál (Oroszország) rutinszerűen bevált módszer, melyet alkalmaznak a halgazdálkodási gyakorlatban (Tiersch, 2000).

Laboratóriumi, kísérleti és nagy értékkel bíró genetikai állományok esetében a módszernek fontos jelentősége van pl. zebradánió, medaka, bödőnhál stb. esetében, de ezen módszerek is csak szűk körben kerülnek felhasználásra.

Vitathatatlan tény, hogy a haltermelés intenzifikálásával egyrészt előtérbe kerül az egyedi szelekció és a molekuláris markerek alapján végzett tenyésztés, ahol a tenyészállományok szintjén az egyed fontossága is növekszik, aminek eredményeként annak örökítő anyaga is értékke válik. Másrészt tenyésztésbe vonnak olyan fajokat, mint pl. a barramundi (*Lates calcarifer*), ahol az ivarátfordulás miatt a hímek csak rövid ideig használhatók, illetve a mélyhűtés lehetővé teszi az öntermékenyítést, ami klasszikus állattenyésztési értelemben magasan beltenyésztett vonalak kialakításával és keresztezésével jelentős heterózishatást eredményezhet.

Több országban mélyhűtött hal spermabankokat hoztak létre, többek között hazánkban is a HAKI koordinálásával, és Tanszékünk hathatós segítségével, de ezen génbankok is egyes halfajok, tájfajták és változatok genetikai megőrzését szolgálják, nem pedig a praktikumot. Még a nagy pusztítást okozó tiszai ciánszennyezés sem világított rá arra a tényre, hogy halaink ivarsejtjeinek hűtése, és mélyhűtött formában való tárolása lehetőséget biztosít a környezeti katasztrófák utáni visszatelepítésekben, és a tenyésztői, szaporítói munka segítségével hathatós eszköze lehet. Ehhez a munkához a szakember gárda adott, több kutatóintézetben is megvan az a humánerőforrás és infrastrukturális háttér, amelyet a gyakorlat számára hasznosítani lehet és kész segíteni a tenyésztői és természetvédő tevékenységet.

Alapvetően **két konkrét ok van, amelyek a módszer térnyerését hátráltatják:**

1. Univerzális, minden halfajra egységesen használható módszer hiánya. Ennek hiányában általában a hal családokra különböző spermamélyhűtési technológiát szükséges kidolgozni, nincsen standard módszer. A meglévő módszerek jelentős hányada laboratóriumi háttérhez kötött, gyakorlati alkalmazhatósága szinte kizárható, terepi munkálatokra alkalmatlanok.
2. A kidolgozott módszerek gyakorlatiatlansága. A keltetőházi szaporítás során nagy mennyiségű ikrával dolgoznak a szakemberek, a laborszintű és méretű mélyhűtési háttér nehezen, vagy egyáltalán nem illeszthető bele a keltetőházi technológiába. Nagy mennyiségű ikrához nagy mennyiségű mélyhűtött sperma szükséges, melynek megvalósítása napjainkban nem megoldott.

A fentiek, valamint az eddigi kutatási tapasztalataim alapján -1991 óta folytatok kísérleti munkát a halak ivarsejt mélyhűtésének területén- a jelen dolgozatban az **alábbi célkitűzéseket állítottam fel:**

- Olyan mélyhűtési módszer kidolgozására törekedtem, melynek használata során minimalizálni lehet a változó paraméterek körét, és az a gyakorlat számára alkalmazhatóvá válik;
- Adaptálni a gazdasági emlősfajokban használatos műszalma méreteket a hal ivarsejt hűtéshez, így növelve az egységnyi idő alatt hűthető és felolvasztható sperma mennyiséget, elősegítve annak a keltetőházi gyakorlatba történő beillesztését;
- Gazdasági haszonhalaink közül a legfontosabb halfajok sperma mélyhűtési technológiájának továbbfejlesztése, egyes esetekben adaptálása más fajokra, illetve olyan halfajok spermamélyhűtési technikájának és metodikájának kidolgozása, melyeknél a módszer létjogosultsága vitathatatlan;
- A mélyhűtési technológia génbanki alkalmazásának kidolgozása, és közreműködés a módszertan bevezetésében;
- A mélyhűtési technológia üzemi szintű bevezetése legalább egy, hazai, gazdaságilag jelentős halfaj esetében.

A célkitűzések tekintetében és figyelembevételével a dolgozatban a ponty (*Cyprinus carpio*), folyóvízi pontyfélék (*Cyprinidae*) egyes fajainak, a harcsa (*Silurus glanis*), a süllő (*Sander lucioperca*) és a kecsege (*Acipenser ruthenus*) sperma mélyhűtésének eredményeit taglalom.

Okkal és joggal merülhet fel, hogy miért csak a sperma fagyasztásra koncentráltam? Erre az irodalmi áttekintésben külön kitérek, de napjainkig sajnos – habár nagy erőfeszítéseket fejt ki a kutató társadalom ez irányba – számottevő eredmények a halak ikra- és embrió mélyhűtésében nem születtek. Ezen témával magam és kollégáimmal együtt vannak próbálkozásaink, de ezek még nagyon kezdetleges szinten folynak, és áttörést még jósolni sem merészelek ezen a téren.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az ivarsejt mélyhűtés, mint kutatási terület

A **modern mélyhűtés mérföldkövének tekintjük** Polge és munkatársai felfedezését, akik 62 évvel ezelőtt glicerinnel védőanyaggal fagyasztottak baromfi spermát, és a felolvasztás után élő-mozgó, túlélő spermiumokat detektáltak (Polge et al., 1949).

A hal ivarsejtek **alacsony hőmérsékleten végzett tárolásra irányuló kísérletek azonban jóval korábban datálódnak**. Az élő sperma rövid ideig tartó tárolását alacsony hőmérsékleten Ovszjanyikov, orosz (szovjet) kutató írta le először 1868-ban, aki lazac (*Salmo salar*) és maréna (*Scomber scombrus*) spermáját 48 óráig tárolta. Ljebjedincev és Nyedoszivin kezdték el először az életképesség meghosszabbítását adalékanyaggal, 1%-os etanol oldatot alkalmazva 8 napig tartotta meg a sperma a termékenyítőképeségét.

Pisztrágon Scheuring 1925-ben próbálta az „etanolos” módszert megismételni, sikertelenül. Wiesner 1934-ben kísérleteiben 8-10 °C-on a sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) hímivarsejtjei 5 napig tartották meg aktív állapotukat. Butcher 1944-ben a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) spermáját 5 napig tartotta életben 3 °C-on, folyékony paraffinban (Svéda, 1973).

Ezt követően Polge és munkatársainak eredményei más megvilágításba helyezték a kutatásokat, és elindult az a folyamat, melynek eredményeképpen **napjainkig mintegy 200 halfaj spermájának mélyhűtését** dokumentálták (Tiersch, 2000).

A technika-technológia térnyerésének okait vizsgálva két főbb magyarázatot adhatunk a mélyhűtés fejlődésére (Rana, 1995):

- a haltenyésztésben is használják a nemesítés (keresztezés és szelekció) módszereit, ami magával vonja az értékes tenyészegységek ivartermékének hosszú távú tárolásának szükségességét,
- fontos tényező a mélyhűtés génbanki szerepe a különböző védett, veszélyeztetett fajok fenntartásában is.

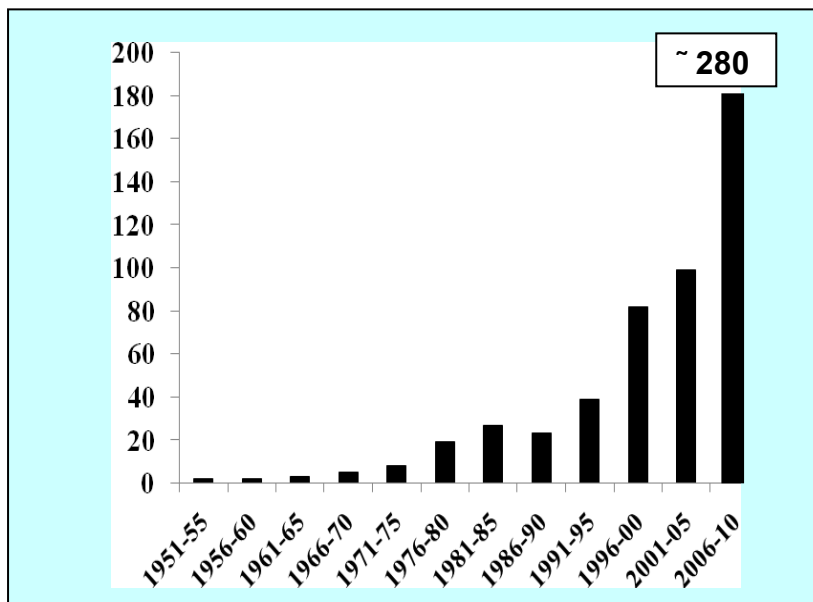
A kutatási módszertan fokozatosan fejlődött, és a újabb és újabb ismeretek más és más kérdéseket generáltak.

Disszertációmban a tradicionális mélyhűtési metodikát követem, és mutatom be az eredményeimet: vagyis védőanyag és hígító optimalizálás során, a mélyhűtési, felolvasztási és alkalmazási technológia standardizálása mellett igyekeztem eredményeket produkálni.

Időközben a tudomány fejlődésével számos **modern technológia** is bevezetésre került. Ilyen pl. a sperma motilitást objektívan analizáló **CASA technológia** (későbbiekben tárgyalom), mely nagyságrendekkel pontosabbá tette a spermaminősítést. Ilyen eszköz használatára a disszertációmban bemutatott munkák során azonban alkalmam nem volt (egy ilyen, csúcskategóriás berendezést az idei évben vásárolt Tanszékünk). Hasonló fontos, a gyakorlat által generált kérdés volt a mélyhűtött spermából kelt **ivadékok vitalitása**, túlélési esélyeinek problémaköre. Ezt szintén nem vizsgáltam a disszertációmban bemutatott fajokon, mert ezen vizsgálatok szükségességére az utóbbi időszak világított rá, illetve tanszéki kollégám ezen területtel is foglalkozott és adott megnyugtató válaszokat a felmerült kételyekre

(későbbiekben szintén kitérek ezen kérdéskörre). Az utóbbi 10 évben a kutatások súlypontja az újabb halfajok spermamélyhűtési technológiájának kidolgozásán túl, a mélyhűtés okozta károsodások és a sperma minőség alaposabb vizsgálatára irányult. A mélyhűtés okozta DNS károsodások felderítésére a kutatók a **Comet assay** elnevezésű módszert alkalmazták sikerrel (Labbe et al., 2001; Cabrita et al., 2005; Miskolczi et al., 2005). A mélyhűtést követően a spermiumok életképességének tesztelésére az **élő-halott fluoreszcens festési eljárás** adott lehetőséget (Flajshans et al., 2004). A módszer pontossága áramlásos **citométeres (flow cytometer) vizsgálattal** kombinálva tovább javítható (Liu et al., 2007; Horváth et al., 2008a)

A fentiek mellett évről-évre újabb fejlesztések, a tudomány fejlődésével modern high-tech berendezések szolgálják a kutatókat, és ennek is köszönhető, hogy az **elmúlt 10 évben** ugrásszerűen növekedett a vízi szervezetek sejtjeinek mélyhűtésével foglalkozó irodalom (Tiersch, 2011). Ezen irodalmak a különböző szövetek, sejtek fagyasztása mellett jelentős számban tartalmazzák a gaméta és embrió fagyasztással kapcsolatos közleményeket és cikkeket (2. sz. ábra).



2. sz. ábra: A vízi szervezetek sejtjeinek mélyhűtési irodalmának változása (Tiersch, 2011)

Külön szimpóziumok foglalkoznak a hal ivarsejtek biológiájával és ezen találkozók alkalmával külön szekció tárgyalja az ivarsejt mélyhűtés aktualitásait. Ennek a tanácskozásnak adott otthont legutóbb hazánk, mely egyben jelentette a hazai hal ivarsejttel foglalkozó kutatók elismertségét is (<http://fish-gametes2011.org>).

A **fentiek alapján kijelenthető**, hogy az ivarsejt mélyhűtés, ennek vízi ökoszisztémák fajaival foglalkozó ága az elmúlt években kimagasló fejlődésen ment keresztül, létjogosultsága elvitathatatlan az élő természettudomány berkein belül.

2.2. A mélyhűtés alapelvei

2.2.1. A víz és vizes oldatok fagyása

Az élő anyag mélyhűtési folyamatának megértéshez a vizes oldatok hűlésének és fagyásának alapjaival szükséges tisztában lenni, mivel az elvrendszer szinte teljesen

megegyezik. A víz fagyáspontja $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, az ionokat és egyéb oldott anyagokat tartalmazó vizes oldat ennél alacsonyabb hőmérsékleten fagy meg. Ideális esetben az oldatból először a víz fagy ki, mivel a jég kristályrácsába elsősorban vízmolekulák épülnek be. Ennek eredményeként a hátramaradó oldat besűrűsödik és fagyáspontja is süllyed. Ez a folyamat az úgynevezett **eutektikus pontig** folytatódik, amikor az oldat sűrűsége eléri lehetséges maximumát és megfagy.

A természetben, természetes körülmények között a fagyás még tiszta víz esetében sem mindig $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on megy végbe, hanem a víz, vagy oldata túlhűl, azaz a hőmérséklete a fagyáspont alá süllyed, de az oldat folyékony marad. A jégképződés úgynevezett **kristályosodási magok** körül indul el. A magképződés lehet homogén és heterogén. Az előbbi esetben koncentrációkülönbségek szerepelhetnek jégmagként, míg az utóbbi esetben különböző szennyeződések, vagy az oldattal érintkező felületek egyenetlenségei okozzák a magképződést. Heterogén mag hiányában az oldat akár $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig is túlhűlhet, ahol spontán homogén magképződés indul el, és az oldat megfagy.

A víz és oldatai a fagyás közben felmelegszenek a valódi fagyáspontjukra, mivel a folyékony halmazállapotból a szilárdba való átmenetből származó energia felszabadul és a keletkezett hő megemeli az anyag hőmérsékletét. Ezután az egész anyag átalakul kristályos jéggé (Denniston et al., 2000).

Az oldatok hűtésének létezik ezen kívül egy másik módja, az úgynevezett **vitrifikáció**. Ez az ultragyors hűtési eljárás üvegszerű amorf állapot kialakulását eredményezi, kristályos jég képződése nélkül. A vitrifikáció nem jár együtt a molekuláris kapcsolatok megváltozásával a folyékony halmazállapothoz képest, hanem egy olyan szilárd állapotot eredményez, amely mintegy "pillanatfelvétele" a cseppfolyós állapotnak (Fahy et al., 1984). Mivel ilyenkor nincs vízleadás és jégképződés – a lehűtött anyag változatlan formában rögzül – ez lenne az ideális módszer a hűtésre, azonban a sikeres vitrifikációhoz a különböző védőanyagok olyan töménységű alkalmazása szükséges, amelyet csak bizonyos sejttípusok tolerálnak, de a leggyakrabban mélyhűtött anyag, a sperma nem visel el (Horváth és Urbányi, 2000).

2.2.2. Az élő sejtekben és szövetekben végbementő folyamatok

A hűtés elvi alapjait az élő anyagban egy nagyon fontos tényező befolyásolja: a **sejtmembrán**, amely féligáteresztő hártaként az ozmotikus folyamatokat szabályozza, tehát vizet és kisebb molekulákat átenged, míg a nagyobb méretű molekulák áramlását akadályozza. Az ozmózis elve szerint a féligáteresztő hártán mindig a hígabb oldatból a töményebb felé történik a vízáramlás, tehát a hígabb oldat igyekszik felhígítani a töményebbet és nem fordítva.

Habár a citoplazma fagyáspontja $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ fölött van, a sejtekben az oldat általában $-10\text{--}15\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig túlhűl. Ez két tényezőre vezethető vissza: a sejtmembrán képes meggátolni a jég behatolását a sejtekbe még akkor is, amikor a jégképződés az extracelluláris térben már megindult, a másik, hogy a sejtekben nincsenek jelen hatékony magképző elemek (Mazur, 1970). Az ozmózis szabályai alapján, amikor a sejtközi térben elindul a kristályos jég képződése a sejtben lévő túlhűlt oldat igyekszik vízleadással kiegyenlíteni a kialakuló ozmotikus nyomáskülönbséget az intracelluláris és az egyre besűrűsödő extracelluláris tér között. Ha erre nincs a sejtnak ideje, mert a hűtés sebessége túl nagy, akkor a sejtben nagyméretű jégkristályok alakjában megindul a jégképződés, amelyek roncsolják a sejt belső szerkezetét, elsősorban a membránt (Mazur, 1963; Leibo, 1980). A vízleadást

segíthetjük alacsonyabb eutektikus ponttal rendelkező védőanyagok hozzáadásával. A sejtek vízleadása azonban addig nem indul meg, amíg az extracelluláris folyadékban el nem kezdődik a jégmagképződés. Amennyiben hagyjuk a sejteket tartalmazó folyadékot is magképzés nélkül túlhűlni, akkor a fagyás ismét csak gyorsan, nagy jégkristályok képzésével zajlik le, ami a sejt halálához vezet. Ezért a folyadék túlhűlését megakadályozandó, adott hőmérsékleten mesterséges magképzést, ún. seedinget használnak, ami a gyakorlatban úgy zajlik, hogy egy lehűtött tárgyat (pl. csipeszt) hozzáérintenek a folyadékhoz. Sperma mélyhűtésnél nincs szükség seedingre.

Ha lassú hűtéssel a sejt vízleadását segítjük, az a sejt kiszáradásához vezethet, ami szintén letális hatású. A **kutató feladata** megtalálni azt az ideális hűtési sebességet, ahol a vízleadás már olyan mértékű, ami megakadályozza a nagyméretű jégkristályok kialakulását, de még nem vezet a sejt végleges kiszáradásához. A vizes oldatok fagyásának korszerű elmélete szerint a megfagyott oldat két részből áll: a jégkristályokból és a bekoncentrált, oldott anyagokat tartalmazó kristályszerkezet nélküli szilárd amorf részből. Az amorf rész aránya függ az oldat koncentrációjától és a hűtési sebességtől. Minél nagyobb a koncentráció és a hűtési sebesség, annál nagyobb lesz az amorf, vitrifikálódott rész aránya.

Az élő anyag mélyhűtésének és tárolásának másik nagy lehetőségét a vitrifikáció rejti magában. A folyadék kristályosodásával szemben az üvegszerű állapot képzése jelenlegi tudásunk szerint semmiféle károsodást nem okoz a sejtekben. A sikeres vitrifikáció, azonban, a védőanyagok olyan magas koncentrációját követeli meg, amely adott esetben toxikus lehet a sejtekre nézve. A másik oldalról nézve, viszont, megállapítható, hogy a jégkristályok képződésével járó fagyás végeredményét nézve még magasabb és még károsabb védőanyag-koncentráció létrejöttével jár, mivel a víz kifagyásával a védőanyagok koncentrációja is növekszik (Fahy et al., 1984). A vitrifikáció másik nagy korlátja, hogy az üvegszerű állapot nem stabil, a használható védőanyag-koncentrációk mellett - főleg felolvasztás közben - könnyen előfordulhat, hogy az oldat devitrifikálódik, tehát kristályos fagyás következik be.

Felolvasztásnál szintén vigyázni kell az optimális felolvasztási sebességre. Amennyiben a felolvasztás sebessége túl alacsony az eredetileg kisméretű jégkristályok nagyobb kristályokká egyesülhetnek az olvasztás folyamán, ami ismét csak a sejtorganelumok szétroncsolását eredményezi. Ezért a felolvasztás sebességét általában percenkénti 1000°C-nál magasabbra kell megválasztani (Denniston et al., 2000).

2.2.3. A védőanyagok

A védőanyagok vagy krioprotektánsok alacsony toxicitású és nagy vízzoldhatóságú anyagok, amelyeket **két nagy csoportra** osztunk aszerint, hogy behatolnak-e a sejtekbe, vagy sem. Az extracelluláris, be nem hatoló védőanyagokhoz különböző nagy molekulájú polimerek, cukrok tartoznak, amelyek a sejtmembránhoz kapcsolódva azokat stabilizálják. Az intracelluláris, behatoló védőanyagok sorába tartozik a dimetil-szulfoxid (DMSO), dimetil-acetamid (DMA), metanol, glicerin, etilén-glikol és más kis molekulású anyagok. A hűtéshez általában elengedhetetlennek tartják az intracelluláris védőanyagok használatát, az általunk ismert szakirodalom nem tud kizárólag extracelluláris védőanyagok sikeres használatáról. A védőanyagok behatolási sebessége több tényezőtől függ, pl. a hűtésre szánt sejtek típusától, felületüktől, fejlődési stádiumuktól és az intra- és extracelluláris tér közti koncentráció-különbségektől. Ezen kívül természetesen adott

sejttípus esetében az alkalmazott védőanyagok behatolási képességei közt is van eltérés. Így például zebradánió embrióinál tapasztalták, hogy a metanol már 15 perccel a védőanyagokat tartalmazó oldatba süllyesztés után is magas koncentrációban volt jelen a sejtekben (és az idő múlásával ez a koncentráció csak nőtt), míg a DMSO-t és propilén-glikolt tartalmazó oldattal kezelt embriókban még 2 óra elmúltával sem volt tapasztalható számottevő behatolás (Hagedorn és Kleinhans, 2000).

A **védőanyagok hatásmechanizmusa** napjainkban sem pontosan ismert. Tisztázott tény, hogy a védőanyagok használata gyorsítja a sejtek vízleadását a koncentrációkülönbség fenntartása céljából, viszont ezen tulajdonságukon felül minden egyéb funkció ismeretlen. Az azonban bizonyos, hogy a védőanyagok használata elengedhetetlen az élő sejtek és szövetek alacsony hőmérsékleten történő túléléséhez. Mivel a védőanyagok csökkentik az oldat fagyáspontját, amelyhez hozzáadják őket, ezért kevesebb jég képződik (Denniston et al., 2000).

A védőanyagok azonban rendelkeznek bizonyos mértékű toxicitással is. Általános elvként elfogadható, hogy a védőanyagok optimálisnál magasabb koncentrációja esetén már nem a fagyasztás, hanem a védőanyagok maguk fejtenek ki károsító hatást még a hűtés megkezdése előtt (Fahy, 1986). Ezért a **kutató feladata** a krioprotektánsok optimális koncentrációjának megtalálása.

2.2.4. A mélyhűtött sejtek tárolása

A tárolási hőmérsékletnek **-139 °C-nál alacsonyabbnak** kell lennie, ugyanis ennél magasabb hőmérsékleten az amorf jégben a vízmolekuláknak lesz annyi mozgási energiájuk, hogy a kristályszerkezet rácspontjaiba vándoroljanak. Ekkor alakulnak ki a jégkristályok, amelyek közvetlenül okozhatják a sejt pusztulását, vagy a felolvasztás során kristályképződési magként szerepelnek, aminek következtében könnyebben alakulnak ki nagy jégkristályok. Az általánosan elterjedt tárolóközeg a folyékony nitrogén. A folyékony nitrogénnek olyan alacsony a hőmérséklete (-196 °C), ahol a biogén molekulák már csak rezgő és rotációs mozgást képesek végezni, tehát biokémiai folyamatokban nem vesznek részt. Ezért a folyékony nitrogénben tárolt anyagok gyakorlatilag korlátlan ideig eltarthatók változás nélkül. A tárolási idő egyetlen korlátozó tényezője a háttérsugárzás. Számítások szerint egy mélyhűtött sejtpopulációt érő háttérsugárzás 32.000 év alatt éri el az ún. D10 dózist, amelyet a populációnak csak a 10 %-a él túl. Tehát a mélyhűtött anyag emberi léptékkal mérve korlátlan ideig eltartható igen csekély mértékű károsodással (Fahy, 1986).

2.3. A halak hím ivarszervei és ivarsejtjei

2.3.1. A here típusai

A halak spermatogenezise a herében zajlik. Ez két lebenyből álló hosszúkás páros szerv, a hasüreg háti részén található hosszanti irányban. A lebenyek lehetnek részlegesen összenöttek, mint a sügérfélénknél vagy teljesen összenöttek, mint az elevevészülő fogaspontyoknál (Billard, 1986). A here kivezetőcsatornája a végbélnyílás és a húgycső között elhelyezkedő ivarnyílásig, az ivari papilláig tart. A csontoshalak heréjének két fő típusa ismert: a csöves (tubuláris) vagy újabb elnevezéssel korlátozott (restricted) here, és a lebenyes (lobuláris) vagy nem korlátozott (unrestricted) here (Billard et al., 1982). A tubuláris here elsősorban az

elevenszülő fogaspontyokra jellemző, míg a tenyésztett halfajaink lobuláris herével rendelkezik.

A **két fő típus** morfológiájában és spermatogenezis rendszerében tér el egymástól:

1. A csöves here központját egy nagyméretű üreg képezi, ahol a spermiumok spermatozeugmáknak nevezett csomókban találhatók. Ebből az üregből csövek nyúlnak sugárirányban a here szélei felé, amelyekben a spermatogenezis fázisainak megfelelően a csúcstól a központi üreg felé találhatók meg a különböző fejlődési stádiumú hímvarsejtek. A csövek csúcsában található „A”-típusú spermatogóniumok még egyenként fejlődnek, a központi üreg felé haladva az előzőekből kialakuló „B”-típusú spermatogóniumok azonban már cisztákat képeznek és ezek a ciszták folytatják fejlődésüket és haladnak a cső kivezetőnyílása felé, ahol végül egy ciszta alkot majd egy spermatozeugmát (Billard, 1986).

2. A lebenyes herében a hímvarsejtek egy szerteágazó csőrendszerben fejlődnek, amely lebenyeket alkot, ezek falát összekötő intersticiális szövet alkotja. A lobulus elnevezés a csőrendszerre azért indokolt, mert a csövek belső átmérője erősen változó és szövettanilag lebenyszerű szerkezetet mutat. A különböző fejlődési stádiumú hímvarsejtek a csövek lumenének egész felületén mindenhol megtalálhatóak, nincsenek adott csőszakaszhoz kötve. A spermatogenezis során csak kismértékben mozdulnak el a ciszták a lebeny belseje felé. A spermiumok a lobulusok belső üregébe ürülnek, ahonnan tovább szállítódnak a spermavezetéken keresztül a külvilág felé (Billard, 1986).

2.3.2. A here szerkezete

A gazdasági szempontból jelentős halfajokra jellemző lobuláris herében a here külső falától összekötő szövet válaszfalak indulnak ki, amelyek szabálytalan csöveket hoznak létre. A csövek, illetve lebenyek belső falát Sertoli-sejtek alkotják, valamint az ezekben elhelyezkedő fejlődő ivarsejtek. A lebenyek belső vége a külső herefal felé néz. A lobulusok falát alkotó bazális membránt az interlobuláris térben fibroblasztok folyamatos fala határolja, amely távolodva a bazális membrántól ritkább szövetet alkot (Billard, 1986).

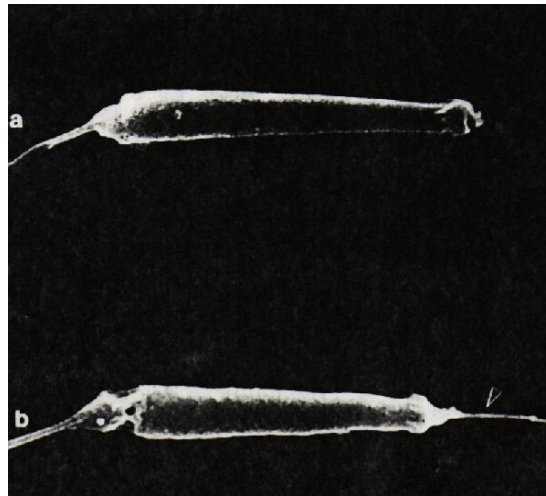
A fejlődő ivarsejteken kívül két fontosabb szomatikus sejtípus lelhető fel a herében. Az interlobuláris térben a fibroblasztok között elszórt sejtcsoportokban található az úgynevezett intersticiális sejtek, amelyek szexuálszteroidhormon-termelésük miatt a fejlettebb gerincesek Leydig-sejtjeivel homológok. A Sertoli-sejteknek nevezett sejtek nevének jogosságát több kutató vitatja (Billard, 1972; Roosen-Runge, 1977). Véleményük szerint ezek a sejtek azonban valóban homológok a fejlett gerincesek Sertoli-sejtjeivel, ám működésükben azoktól több ponton is eltérnek. A halak spermatogenezise teljes egészben ezekbe a sejtekbe ágyazottan, azok által körülvéve történik. A fejlődő ivarsejtek nem érintkeznek a bazális membránnal, míg az emlősök heréjében ez a kapcsolat megvan. Ennek megfelelően ajánlják a ciszta-sejt elnevezést a Sertoli-sejt helyett, amely kizárólag az emlősök esetében használható. A ciszta sejt funkciója azon túl, hogy a fejlődő ivarsejteket tartalmazzák, a tápanyagtranszport a fejlődő ivarsejtekhez és a spermatogenezis végén a visszamaradt spermiumok fagocitózisa.

2.3.3. A halak spermiuma

A csontos halak spermiuma egy igen leegyszerűsített sejszerkezetet mutat, amely nem rendelkezik sem akroszómával, sem perforatóriummal (Stoss, 1983). Az ősi jellegű tokalakúak rendjébe tartozó fajok hímivarsejtjei még rendelkeznek működő akroszómával (Cherr és Clark, 1984), azonban ez a sejszerv a fejlettebb csontoshalak termékenyülés-biológiájának sajátosságai miatt az evolúció során feleslegessé vált és eltűnt (3. sz. ábra).

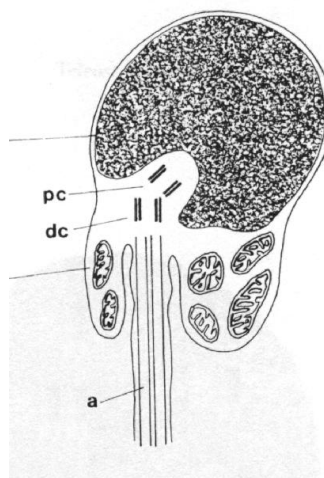
A valódi csontoshalak közül a szívárványos pisztráng spermatogenezisének spermatida fázisában fedeztek fel egy akroszóma-szerű vakuólumot, amely azonban az érett spermiumban nincs jelen (Billard, 1983).

A csontoshalak jellegzetes spermiumtípusaként a pontyfélék hímivarsejtjét lehet bemutatni (Bacetti et al., 1984).



3. sz. ábra: Két tokospermium pásztázó elektronmikroszkópos képe
(a: akroszómareakció előtt, b: akroszómareakció után) (Cherr és Clark, 1984 után)

A spermium feje tartalmazza a gömbölyű, vagy enyhén elliptikus sejtmagot, amely mindig oldalra eltolódva, excentrikusan helyezkedik el a farok tengelyéhez képest (4. sz. ábra).



4. sz. ábra: Az aranyhal (*Carassius auratus*) spermiumának vázlatos felépítése (Bacetti et al., 1984 után). Jelölések: a: axonéma, pc: proximális centriólum, dc: distális centriólum

A fej átmérője 1,5-2,5 μm a pontyféléknél. A sejtmag és a farok között az összeköttetést a két, változatosan elhelyezkedő centriólum (proximális és distális) biztosítja. Ezek közül a distális centriólum a faroktengellyel egy vonalban található, míg a proximális megközelítőleg 120°-os szöget alkot azzal. A halspermium nem rendelkezik az egyéb rendszertani egységek hímivarsejtjeire jellemző kifejezett középdarabbal. A sejtmag után egy, a spermium farkát (flagellumát) gyűrűszerűen körülölelő citoplazmatikus kitüremkedés található, amely 2-10 mitokondriumot tartalmaz. A faroktengely töve és a citoplazmatikus kitüremkedés között egy úgynevezett poszt nukleáris csatorna figyelhető meg. A spermium farka jellegzetes 9+2 elrendezést mutat 9 dupla periférikus és 2 szimpla centrális rosttal. A farok hossza pontyféléknél 36 és 60 μm között változik, jelentős fajok közötti eltéréssel.

A bemutatott sejtípustól számos eltérés ismert a halak között. Így például az *Ictaluridae* családba tartozó harcsafajok spermiuma biflagellált, két farokkal rendelkezik (Mattei, 1991). Különleges spermiumtípussal rendelkeznek a sügéralakúak (*Perciformes*) rendjébe tartozó fajok. A sejtmag a farok tengelyétől teljesen eltávolodott, alapja a flagellum tengelyével párhuzamos, a sejtmag alapján bemélyedés található, ám a centriólumok ezen kívül helyezkednek el. Az irodalmi adatok szerint a sügéralakúak spermiuma egy leegyszerűsített spermiogenezis eredménye, amelyből kimaradt az a fázis, amely során a sejtmag elfordulása a centriólumokat a mag alapi részén található mélyedésbe helyezi (Mattei, 1991).

A herében a spermiumok nyugalmi állapotban vannak. Mozgásuk a szabadba (vízbe, termékenyítő oldatba) kerülve indul el. A szabadba kerülés során háromféle változás mehet végbe, amely a mozgást kiváltja. A legtöbb édesvízi halfajban, pl. a pontyfélékben a mozgás kiváltó tényezője az ozmolalitás csökkenése. A szeminális folyadék ozmolalitása fajtól függően 250-300 mosmol/kg H₂O. Amennyiben ezt az értéket csökkentjük a sejtek mozgása elindul, függetlenül attól, hogy az izotóniás immobilizáló oldat, amiben a spermát felhígítottuk eredetileg milyen komponensekből – sókból, vagy cukrokból – állt (Morisawa et al., 1983), tehát a pontyfélék hímivarsejtjeinél a mozgás fő kiváltó oka az ozmotikus nyomás csökkenése. Ezzel szemben a pisztrángfélék spermiumait a K⁺ koncentráció tartja mozdulatlanul. Kimutatták, hogy amennyiben a hígító kizárólag NaCl-ot tartalmazott (ami a pontyfélék spermiumait immobilizálta volna), akkor a sejtek még abban az esetben is mozgásnak indultak, amikor az oldat ozmolalitása jóval meghaladta (450 mosmol/kg H₂O) az izotóniás 300 mosmol/kg H₂O értéket (Morisawa et al., 1983). Az aktivált spermiumok igen rövid ideig mozognak, fajtól függően mindössze 30-60 másodpercig. A tengeri halfajok spermiumainak mozgását az extracelluláris ozmolalitás emelkedése aktiválja (Morisawa és Suzuki, 1980), ugyanakkor egyes fajok esetében az aktivációs mechanizmus ennél bonyolultabb is lehet. Az egyik heringfaj, a *Clupea pallasi* spermiumai a többi tengeri halfajhoz hasonlóan aktiválódnak a hiperozmotikus tengervízi környezetben, ugyanakkor a motilitás értéke alacsony marad. Az ikra jelenlétében ugyanakkor a mozgó spermiumok aránya igen magas, ami azt feltételezi, hogy a spermiumok aktivációjához a női ivarsejteken jelen lévő vagy azokkal íváskor együtt ürülő anyagok is hozzájárulnak (Morisawa et al., 1992).

A spermiumok egy különleges típusát képviselik a tokfélék hímivarsejtjei. Az említett működő akroszómán kívül számos tulajdonságukban eltérnek a csontoshalak spermiumaitól. A feji részük erősen megnyúlt, nem gömbölyded, hanem hosszúkas, hengeres alakú. Hossza 7 μm körüli. A mozgáshoz az energiát biztosító mitokondriumok nem egy poszt nukleáris csatornában, hanem egy jól kifejezett középdarabban találhatóak. Az akroszomális régióhoz egy rostos anyagot tartalmazó

szubakroszomális terület kapcsolódik, amelyből kiindulva 3 csatorna fut végig a fej belsejében egyfajta hármás hélixet alkotva (Cherr és Clark, 1984). A szeminális folyadék ozmolalitása nagyságrendekkel alacsonyabb a csontoshalaknál tapasztalt értéknél: 40-80 mosmol/kg H₂O körüli. Mivel így a vízbe ürítés során az ozmotikus nyomásváltozás nem olyan drasztikus, mint a csontoshalak spermiumai esetében, a tokfélék spermiumai 5-6 percig (szélsőséges esetben 1 óráig) is mozognak. Akárcsak a pisztrángféléknél, itt is elsősorban K⁺ koncentráció tűnik felelősnek az immobilizációért (Gallis et al., 1991).

2.3.4. A spermatogenezis folyamata

A korai egyedfejlődés során a hasüreg hátsó falán már a kelő pontylárvában észrevehetőek a gyöngysorszerűen elhelyezkedő elsődleges ősvarsejtek (Parmentier és Timmermans, 1985). Ezek jól felismerhetők nagy méretükről (15-25 µm), tojásszerű alakjukról és nagyméretű sejtmagjukról (7-10 µm). A primordiális gonádsejtek száma 50 körüli, mitotikusan osztódni képesek, és két további gonádsejttípust hoznak létre, amelyek közül legalább az egyik megtalálható a felnőtt hímivarú egyedekben. Ezek a primordiális „A” típusú spermatogóniumok. Az ivarszerv differenciálódása petefészekké és herévé az egyedfejlődés 10. hetében következik be a pontyban (Parmentier és Timmermans, 1985). A primordiális ivarsejtekből létrejövő „A” típusú spermatogóniumok már állandó résztvevői a spermatogenezisnek. Ezek a legnagyobb méretű sejtek a fejlődő herében, és jellemzőjük, hogy mindig egyesével állnak. A cisztákká rendeződött és az előzőekből kifejlődő újabb sejttípus a „B” típusú spermatogónium. Ezekre csökkenő sejt és sejtmagméret a jellemző (Billard, 1990).

Az ivarsejtek fejlődésének következő állomását képezik az elsőrendű spermatociták, amelyekkel elkezdődik a meiózis folyamata. Pontynál ez a fázis a fejlődés 20. hetében figyelhető meg először. A B típusú spermatogóniumoktól a nagyméretű sejtmag és az erősen megnövekedett méretű ciszta különbözteti meg az elsőrendű spermatocitákat. Az elsőrendű spermatocitákból létrejövő n kromoszómaszámú másodrendű spermatocitákat tartalmazó ciszták száma kevés, ami azt valószínűsíti, hogy ez a fázis halaknál igen rövid.

A másodrendű spermatociták osztódása befejezi a meiózis folyamatát és létrehozza a haploid spermatidákat. A spermatidák gömbölyű sejtek, amelyek belépve a spermiogenezis folyamatába, létrehozzák a termékenyítésre érett spermiumokat. A sejtmagban a kromatin fokozatos átalakulása és besűrűsödése figyelhető meg, azonban halakban ez korántsem olyan kifejezett és erőteljes, mint a magasabb rendű gerincesekben. Pisztrágnál a sejtmag enyhén megnyúlik, a centriolumok helyzete keveset változik, és a középdarab mitokondrium-gyűrűvé egyszerűsödik (Billard, 1983). Ponty és csuka esetében a sejtmag és így a spermium feje gömbölyű marad, és a farok a módosulatlan centrioláris komplexumon keresztül csatlakozik a fejhez (Billard, 1969).

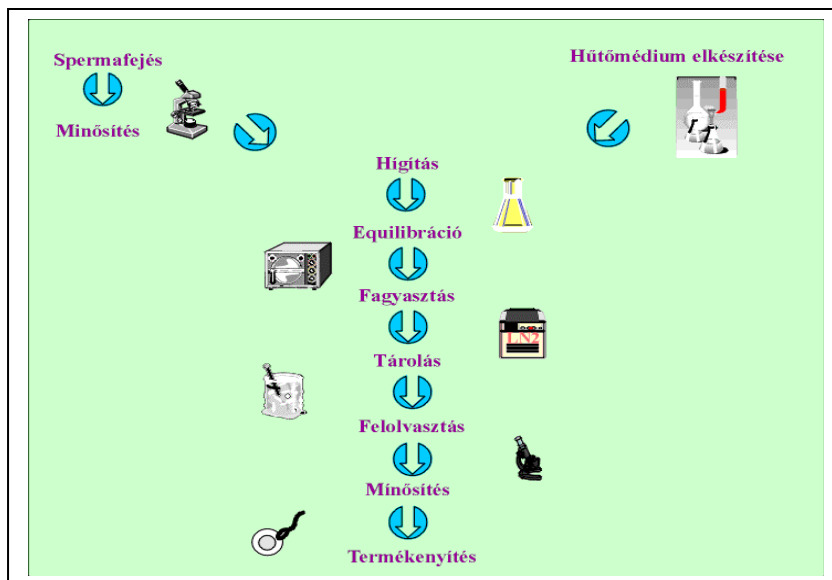
A tubuláris herével rendelkező fajok spermatogenezise egész évben folyamatos. A lobuláris heretípusra azonban a ciklusosság jellemző. **A ciklusosság jellege alapján két, jól elkülöníthető csoportra lehet felosztani a spermatogenezist.**

1. Pisztrángtípus. Két teljes mértékben elkülönülő ciklusra bontható a spermatogenezis. Kizárólag az „A” típusú spermatogóniumok vannak folyamatosan jelen a herében, az összes többi fejlődési stádium, valamint az azokat tartalmazó ciszták teljes mértékben eliminálódnak a következő ciklus kezdete előtt. A pisztrángféléken kívül ez a típus jellemző a

- bodorkára (Escaffre és Billard, 1976), a csukára (Billard et al., 1983), a compóra (Breton et al., 1980) és általában a legtöbb mérsékeltövi halfajra.
2. Pontytípus. A két egymást követő ciklus nem különül el olyan élesen, mint az előző típusnál. Az „A” és „B” típusú spermatogóniumok, valamint a spermiumok folyamatosan jelen vannak a herében. A spermatogenezis itt is időszakos, de a ciklusok átfedik egymást. Ha a ponty egyedeket folyamatosan 10 °C feletti hőmérsékleten tartjuk, bármely évszakban képes termékenyítőképes spermát termelni, feltéve, hogy gonadotróp stimulus éri a hímeket.

2.4. A halsperma-mélyhűtés folyamata

A halsperma-mélyhűtés folyamatának főbb lépései jól kidolgozott, több évtizedes kutatás-fejlesztések eredményei. Viszonylag jól standardizált metodika, mely az édesvízi haszonhalak esetében kiválóan működik. A főbb lépéseit mutatja be az 5. sz. ábra.



5. sz. ábra: A halsperma-mélyhűtés jelentősebb lépései (Urbányi et al., 2004)

2.4.1. A spermamélyhűtés története

A spermamélyhűtés, mint biotechnikai eljárás története viszonylag fiatal: az első dokumentált lépésének Polge és munkatársai (1949) munkáját tekintjük, akik glicerinnel segítve fagyasztottak baromfi spermát, majd a felolvasztást követően mozgó sejteket detektáltak. Ez a kísérlet bizonyította a védőanyagok jelentőségét, rámutatott arra a tényre, hogy védőanyagok alkalmazásával a sejtek túlélnek az extrém hideg körülményeket is. Polge és munkatársainak felfedezését követően a krioprezerváció technikája, az ezt célzó kutatások jelentős fejlődésnek indultak. A kutatások elsősorban a gazdasági haszonállatok, így értelemszerűen a gazdaságilag legjelentősebb állatfaj, a szarvasmarha esetében történt sikeres előrelépés Smith és Polge (1950) kísérleteivel, majd a fejlődés következő lépcsőfokaként az első mélyhűtésből származó borjú születését publikálta Stewart (1951), aki -79 °C-ra mélyhűtött és felolvasztott bikaondót használt az inszemináció

során. A szarvasmarha esetében napjainkra külön iparággá vált a spermamélyhűtés, mely üzemi gyakorlattá fejlődött és nagymértékben hozzájárult a genetikai előrehaladás gyorsításához.

A halspermamélyhűtés hasonló mérföldköveként Blaxter (1953) kísérletét tekintik, akinek a szárazjég (-79 °C) hőmérsékletéről sikerült életképes hering spermiumokat felolvasztani. A '90-es évek közepéig mintegy 200 halfaj spermáját hűtötték sikerrel kutatók a világ számos pontján (Tiersch, 2000), mely érték napjainkig csak növekedett. A csontoshalak közül a pisztrángfélék (*Salmonidae*) spermamélyhűtése fejlődött a leggyorsabban, köszönhetően annak, hogy számos kutató csoport dolgozott és dolgozik a világ minden pontján többek között a szivárványos pisztráng hímivarsejtjének mélyhűtési technikáján, mely így közel áll az üzemi alkalmazáshoz.

2.4.2. A sperma kinyerése

Mesterséges körülmények (keltetőházi indukált szaporítás során) között a beoltott halak spermáját fejéssel nyerik a teljes egyedektől. Ilyenkor vigyázni kell arra, hogy az ivartermék ne szennyeződjön vizelettel, bélsárral, vagy vérral, mert esetleg aktiválhatja a spermiumokat, rontva a termékenyülés esélyeit. A halak többségénél (pl. ponty, tokfélék, süllő stb.) a spermanyerés egyszerűbb folyamat, a harcsák fejése anatómiai sajátosságaik miatt azonban nehézkes, a hagyományos fejés nem használható módszer, így a halak heréjét ki kell operálni és közvetlenül abból nyerik ki a spermát.

2.4.3. A natív sperma minősítése

A minősítés során az alábbi szempontokat vizsgálják:

1. a haladó mozgást végző spermiumok %-os aránya,
2. a haladó mozgás ideje,
3. a haladó mozgás intenzitása,
4. a sperma mennyisége,
5. a sperma koncentrációja (spermium/ml),
6. a sperma színe és állaga
7. a spermiumok morfológiája.

A gyakorlatban általában az **első 4-5 szempont szerint minősítik a spermát**. A motilitási %-ot és intenzitást többnyire becsléssel, a mozgási időt, a sperma mennyiségét és koncentrációját egyszerű mérési módszerekkel határozzák meg. A becsléshez nagy gyakorlatra van szükség, és sokszor szubjektív. A bikasperma minősítésére ma már egy sokkal objektívebb módszert használnak a motilitási százalék megállapítására, amely a spermiumok átlagos mozgási sebességét is képes mérni. A spermium színe és állaga szintén szubjektív módon minősíthető. A sperma koncentrációját nagy hígításban (ezerszeres-tízezerszeres hígítás) Bürker-kamrás vizsgálattal (400-szoros nagyításnál) lehet megállapítani (Szász, 2007).

A minősítést gyorsan kell elvégezni, hogy a minőségromlást elkerüljük. A spermát felhasználásig 4 °C-on hűtőszekrényben kell tartani, és minél előbb fel kell használni.

Az elmúlt években a sperma minősítési rendszer is nagy változáson ment keresztül, az informatika térnyerésével ez a metodika is modernébbé és objektívabbá vált, a gyorsaság és a pontosság mellett. A **számítógépes spermavizsgálat, azaz a CASA** (computer assisted sperm analysis) rendszer a spermamozgás képi megjelenítésének és analízisének harmadik generációs

eszközét képviseli. A modern CASA rendszerek mögött igen jelentős fejlődési folyamat áll, hiszen már több mint 300 évvel ezelőtt használtak először spermamegfigyelésre alkalmas eszközt.

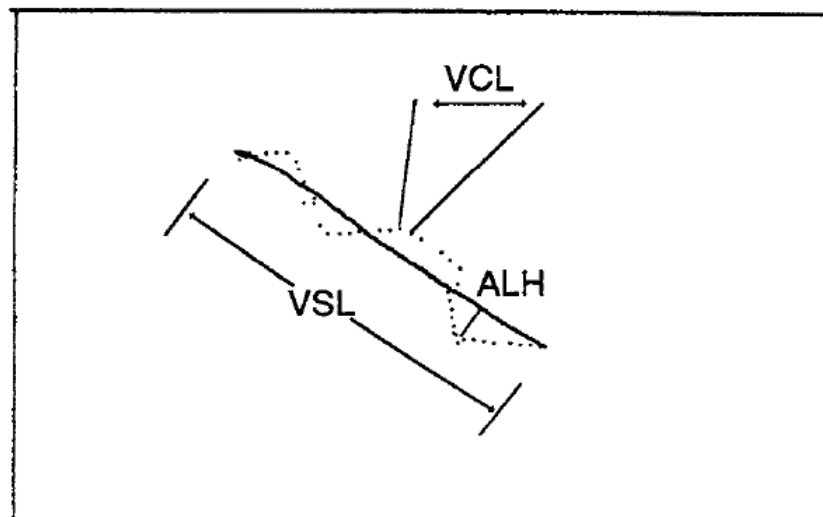
Ma már a CASA egy automatizált rendszer (hardver és szoftver), mely alkalmas a spermamozgásról készült képek egymás utáni megjelenítésére és digitalizálására, valamint az információ feldolgozására és elemzésére is. Ennek következtében képes pontos, precíz és értelmezhető információt szolgáltatni, mind az egyes sejtekről, mind pedig az adott csoportok átlageredményeiről is.

A CASA rendszer alkalmazási területei:

- a spermiumsejtek nyomon követését, valamint a hiperaktív mozgással rendelkező spermiumok automatikus felismerését is (Amann és Katz 2004),
- a környezeti hatások kimutatására is alkalmas, pl. különböző nehézfém-szennyezések (cink és kadmium) hatásait vizsgálták a harcsasperma minőségére nézve (Kime et al., 1996),
- egyszerű és gyors kvantitatív módszer a halsperma minőségének értékelésére, továbbá az eljárás segítségével előre jelezhető a termékenyítő képesség (Kime et al., 2001).

A CASA rendszer kiválóan alkalmas a spermiumok mozgásának detektálására is (Toth et al., 1997). A kutatócsoport tavi tok (*Acipenser fulvescens*) hímivarsejtjének vizsgálatához alkalmazta a berendezést, melynek segítségével az alábbi **paraméterek felvételezése és analízise** lehetséges:

- mozgó sejtek aránya (azok a sejtek, melyek egyenes vonalú mozgást végeztek minimum a küszöbérték feletti távolságig [$25 \mu\text{m/s}$]),
- íves vonalú mozgás sebessége (VCL) (időegység alatt ténylegesen megtett íves vonalú út),
- egyenes vonalú mozgás sebessége (VSL) (a spermafej egyenes vonalú mozgásának kezdő és a végpontja közötti távolsága alapján),
- sperma fejének az oldalirányú amplitúdójának az eltolódása (ALH) (az aktuális útvonal eltolódása egy kalkulált átlagirányhoz képest) (6. sz. ábra).



6. sz. ábra: A spermamozgás analízisének paraméterei (Toth et al., 1997)

2.4.4. A sperma hígítása a hűtőművel

A hűtőmű két fő alkotórészből áll, a hígítóból és a fagyásvédő anyagból.

A hígító egy olyan vizes oldat, amely reverzibilisen gátolja a spermiumok aktivációját. Ez általában cukrok (glükóz, fruktóz, szacharóz, galaktóz, trehalóz, stb.), és/vagy sók (NaCl, KCl, MgCl₂, CaCl₂, stb.) oldata. Az oldatban lévő cukrok extracelluláris fagyásvédőként is működnek. A jó hígító a halspermát reverzibilisen immobilizálja, nem tartalmaz toxikus anyagokat, ozmotikus koncentrációja tolerálható (a hűtés során is), pH-ja megfelelő (általában enyhén lúgos), jó pufferkapacitású (Leung, 1991). A spermiumok mozgásának gátlása az oldat koncentrációjától (ozmotikus nyomásától) függ. A spermiumokat a 300 mosmol/kg H₂O körüli ozmolalitás gátolja a mozgásban. Nagyon fontos a megfelelő koncentráció meghatározása, mivel a kis koncentrációjú oldatban a spermiumok aktiválódnak, a túl tömény oldatban pedig a gátlás irreverzibilis lesz (a spermiumok lassan dehidratálódnak). A megfelelő töménység egyszerű kísérletsorozattal meghatározható. A hígítókhoz alkalmazhatunk puffer-rendszereket (NaHCO₃-CO₂ és Tris-HCl), melyek a fagyasztáshoz biztosítják a pH-érték megfelelő szinten tartását. Az immobilizációs oldat savas környezete (pH 5,6) lecsökkenti az ondósejtek metabolikus aktivitását, de Billard (1972) szerint ez az ondósejtek termékenyülésére nézve nem hátrányos. Ekkor a Tris helyes koncentrációját külön meg kellett állapítani, ami végül 1,65 mmol/l-nél eredményezte a legjobb felolvasztás utáni motilitási eredményeket (12%). A Tris koncentrációjának növelésével fokozódott a motilitás is. Az NaHCO₃-CO₂ esetében nem volt szükséges további kísérletekre, mert az NaHCO₃ mennyisége nem befolyásolja a pH-értéket (Linhart et al., 2005).

Harcsa fajban közepes eredményeket értek el abban az esetben, amikor puffer-rendszereket egyáltalán nem alkalmaztak. Az sem okozott különösebb eltérést a különböző puffer-rendszerek között, amikor a mesterséges ondóplazmát használták hígítóként. A legmagasabb termékenyülési rátát a fruktóz oldat alkalmazásával, száraz termékenyítéssel érték el (84,43%), míg a glükóz oldattal lényegesen kisebbet (71,25%), de itt a nedves termékenyítési módszer jobb eredményeket mutatott (78,5%) (Linhart et al., 2005).

Amikor afrikai harcsánál egy kísérletben a hígítók hatását vizsgálták a legjobb eredményeket egy 333 mmol/l-es, 6%-os fruktóz oldattal érték el, melyhez NaHCO₃-CO₂- puffer-rendszert alkalmaztak. Az NaHCO₃ használatakor nem találtak jelentős eltérést a fruktóz, glükóz és szacharóz oldatok között csakúgy, mint a puffert nem tartalmazó glükóz esetében. A sóoldatok alacsonyabb motilitási százalékot mutattak az esetek többségében, mint a szacharidok vagy a már korábban említett mesterséges ondóplazma. A szacharidokat tekintve minden esetben az NaHCO₃-CO₂ volt a legeredményesebben alkalmazott puffer (Urbányi et al., 1999).

A fagyásvédők a hűtés során lejátszódó kristályosodási folyamatok ellen hatnak. A hűtés sikerességét befolyásolja a szer fajtája, mennyisége, hatásideje, és a sejttel való kölcsönhatás hőmérséklete. A különböző fagyásvédők toxicitása és behatoló képessége eltérő. A kis mennyiségű krioprotektáns nem fejt ki elég erős védőhatást, a túl nagy mennyiségű pedig a toxicitása révén lehet veszélyes a sejtre. A toxicitás csökkenthető a hőmérséklet csökkentésével, de ebben az esetben növekszik a behatolás időtartama, tehát hosszabb egyensúlyozási időre van szükség. A fagyásvédőket általában 5, 10, 15 %-os koncentrációban alkalmazzák.

A sperma-hűtőmű arányt általában 1:1 és 1:10 között állítják be. Harvey a mozambiki tilápia (*Oreochromis mossambicus*) spermáját vizsgálva (1983) 1:5 fölötti hígításban már nem kapott jobb eredményt. A hígításkor kialakult

spermakonzentrációt a termékenyítés során figyelembe kell venni. A hígítást alacsony hőmérsékleten (0-4 °C) érdemes végezni a védőanyag toxicitásának csökkentése érdekében.

2.4.5. Az egyensúly

Az egyensúly a védőanyag-konzentráció kiegyenlítődése az extracelluláris és az intracelluláris tér között. Az egyensúly optimális idejét kísérletileg kell meghatározni, ugyanis ez a spermium membránpermeabilitásától és az adott krioprotektáns behatoló képességétől is függ. Ha a spermium kisméretű és jó membránpermeabilitású, pl. a zebrafishnál, DMSO és metanol alkalmazása esetén nincs szükség egyensúlyos időre (Harvey, 1983). Az egyensúly hőmérsékletét a toxikus hatások csökkentése érdekében 0 °C körül szükséges beállítani.

2.4.6. A sperma hűtése

Egyensúly után a sperma hűtése alapvetően **három különböző módszerrel** történhet. Az első az ún. pellet-módszer, amikor a hűtőmediumban lévő spermát egy szárazjég-tömb felületén kialakított mélyedésekbe cseppentik (7. sz. ábra) és az így képződött pelleteket azután folyékony nitrogénbe helyezik. A módszer előnyei: egyszerű, hűtőberendezést nem igényel és nagyobb tömegű sperma hűthető egyszerre. Hátrányai: a hűtési sebesség egyenlőtlen és nem állandó (függ a pellet méretétől) és sokszor nem optimális, habár a pisztráng- és tilápiaspermánál megállapított alkalmazható hűtési sebesség igen széles határok között változhat. Pisztrágnál 30-160 °C/perc (Scott és Baynes, 1980), tilápiánál 15-45 °C/perc (Harvey, 1983). További hátránya, hogy a felolvasztáshoz külön felolvasztó medium szükséges és az egyenlőtlen felolvasztási sebesség miatt főként a több ml-es pelletekben újrakristályosodás zajlik le.



7. sz. ábra: Szárazjég-tömb felületén a mélyedésekkel (kép: Horváth A., 2000)

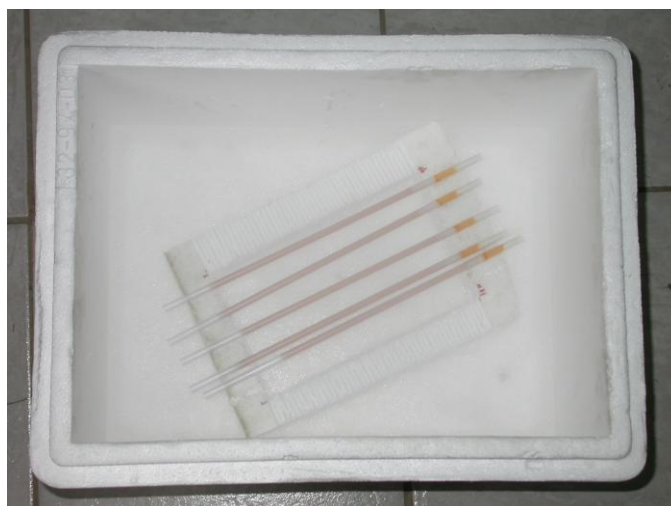
A második módszer a programozható hűtőgéppel végzett mélyhűtés (8. sz. ábra).



8. sz. ábra: "Planer Kryo 10 series III" programozható hűtőgép (www.techtrader.com.au)

A hűtés 250-500 μ l-es műszalmákban történik. Mivel a hűtési sebesség pontosan szabályozható a spermiumoknak jó esélyük van a túlélésre. Hátránya, hogy nagytömegű ikra termékenyítésekor sok időt vesz igénybe a kis mennyiségű spermát tartalmazó műszalmák egyenkénti felolvasztása és felnyitása, ami ronthatja a termékenyülést. Ez a probléma azonban áthidalható alumínium tasakok alkalmazásával (Kurokura, 1984). Mivel azonban a mélyhűtő állomások a sperma műszalmákban történő tárolására rendezkedtek be (és üzemi méretű mélyhűtés esetén a halakra kidolgozott metodikának a már meglévő telepek technológiájához kell majd alkalmazkodnia), így elsősorban a műszalmás hűtés marad a jövőbeni vizsgálatok tárgya. Újabban sikeres vizsgálatok folytak nagyobb űrtartalmú - 1,2 és 5 ml-es - szalmák bevezetésére a pisztrángfélék spermájának mélyhűtése során (Lahnsteiner et al., 1997).

A harmadik lehetőség a folyékony nitrogén feletti, annak gőzében való hűtés. A módszer lényege, hogy egy hőszigetelő, pl. polisztirol dobozba folyékony nitrogént öntenek, és attól megfelelő magasságra helyezik el a műszalmákat, majd bizonyos idő elteltével a nitrogénbe dobják őket. Olyan megoldás is létezik, ahol a nitrogén felszínén úszó polisztirol lapra helyezik a műszalmákat (9. sz. ábra).



9. sz. ábra: Mélyhűtés polisztirol dobozban (kép: Bokor Z., 2005)

2.4.7. A tárolás

A mélyhűtött minták tárolása **-196 °C-on folyékony nitrogént** tartalmazó kaniszteres kannában történik. Mivel -130 °C alatt nincsenek kémiai reakciók és a fizikai hatások (pl. háttérsugárzás) okozta károsodás csekély, ezért a sperma folyékony nitrogénben korlátlan ideig tárolható. A nitrogén párolgása miatt fontos a rendszeres utántöltés, hogy a tárolás hőmérséklete állandó legyen.

Itt kell megemlíteni, hogy a szalmák és kaniszterek megfelelő jelölése alapvető fontosságú, mivel a lehűtött mintákat gyakran hónapokig, vagy évekig is tárolják felhasználásuk előtt. A pontatlan jelölés késleltetheti a feldolgozást, a legrosszabb esetben pedig a génbanki alkalmazás esetén a genetikailag faj- és fajtatiszta állományok keveredését eredményezheti. Kísérletes alkalmazásnál a szalmák jelölésében minimális követelmény, hogy pontosan jelöljük a vizsgált kísérleti változókat. Génbanki és tenyésztési használatnál a szalmák egyedi jelölésére már közvetlenül a szalmára nyomtató gépeket használnak, amelyek az összes fontos információt tartalmazzák, úgy mint az állat egyedi jele, a használt védőanyag, annak koncentrációja, a hűtés időpontja stb. (Wayman és Tiersch, 2000).

2.4.8. A felolvasztás

A pellet-módszerrel hűtött sperma felolvasztása speciális médiumban történik pl. pisztrángnál NaHCO₃ oldatban (Stoss és Holz, 1983). A műszalmában lévő spermát vízfürdőben olvasztják fel, amelynek hőmérséklete 0 °C-tól 60-70 °C-ig terjedhet. Az alacsony hőmérséklet előnye lehet a védőanyagok felolvasztás utáni toxicitásának csökkentése, hátránya viszont a lassabb felolvasztás.

2.4.9. Termékenyítés felolvasztott spermával

Felolvasztás után a spermiumok a natívtól eltérő mozgást mutathatnak (Billard, 1978; Leung, 1987). A mozgási idő jelentősen csökkenhet, pl. groupernél (*Epinephelus malabaricus*) a natív sperma mozgási ideje 30 perc, a felolvasztotté pedig 30 másodperc volt (Withler, 1982). A felolvasztás után a sperma termékenyítőképessége gyorsan csökken, ezért a termékenyítést haladéktalanul el kell végezni, pl. felolvasztott pisztrángspermával azonnal és 30 másodperc múlva termékenyítve a termékenyülés 72 és 56 % lett (Stoss és Holz, 1981). A mélyhűtött amursperma teljes foszfolipid-tartalma szignifikánsan csökkent, tekintet nélkül a lipid telítettségére (Drokin et al., 1985). Mélyhűtött pisztrángspermiumokban a Na⁺ és a Ca⁺⁺ ionkoncentráció nőtt, a K⁺ és a Mg⁺⁺ ionok koncentrációja pedig csökkent. Feltételezhetően ennek volt köszönhető a termékenyítőképesség csökkenése (Kurokura és Hirano, 1980). A termékenyítéshez általában az ívási időszak vízhőmérsékletének alsó határa az optimális, mivel alacsonyabb hőmérsékleten a spermiumok energiakészletüket lassabban merítik ki. A hűtési eljárás okozta mortalitás és minőségromlás miatt mélyhűtött spermából több szükséges ugyanakkora termékenyülés eléréséhez (Kurokura és Hirano, 1980). A gyakorlatban alkalmazott adag rendszerint 50-100 ezer db spermium/ikra. Magasabb és alacsonyabb koncentrációban is érték el termékenyülési sikereket, de 800 db ondósejt/ikra mennyiség alatt már jelentős csökkenést tapasztaltak (Linhart et al., 2003). Pisztrángnál ez a natív spermiumok 15-szörösét jelentette (Stoss és Holz, 1981).

A termékenyítést általában a **felolvasztás utáni legmagasabb motilitási százalékot** mutató hígító- és fagyásvédő koncentrációval végzik, továbbá szükséges a kontrollhoz a natív sperma aktiválhatóságának és az ikra ragadosságának megállapítása. A termékenyítés üzemi körülmények között szárazon folyik, tehát az ikrához hozzáadják a spermát, elkeverik, majd utána öntenek hozzá vizet. (0,25 ml fagyasztott sperma/0,5 ml ikrához 1 ml víz). A mélyhűtött sperma esetében az erősen toxikus fagyásvédő anyagok, mint a DMSO és a DMA károsan hatnak az ikraszemekre és így a termékenyülésre is. Ezért célszerű lehet az úgynevezett nedves eljárás alkalmazása is, amikor az ikrához közvetlenül a felolvasztott spermával való termékenyítés előtt adjuk a vizet, így a fagyásvédők a vízben felhígulnak, és kisebb koncentrációban érik az ikrát.

2.5. A spermamélyhűtés gyakorlati alkalmazása

2.5.1. A spermamélyhűtés standardizálásának lehetőségei

Elsősorban a hímivarsejt mélyhűtéssel foglalkozó kutatók számára vált nyilvánvalóvá, hogy a módszer térnyerésének alapvető kritériuma a módszer egyszerűsítése és egységesítése: standardizálása. Az elmúlt 60 évben számos halfajnak (közel 200 faj) mélyhűtötték a spermáját: melyhez számos változó, és a korábban közöltektől eltérő hígítók, védőanyagok, műszalmák és technológiák társultak.

A 2.2. és 2.4. alfejezetek rámutattak azon tényre, hogy számtalan változó paraméterrel szükséges foglalkozni a mélyhűtés során, melyek nagymértékben meghatározzák az alkalmazott módszer sikerességét.

Amennyiben filozófiai megközelítéssel tekintünk a mélyhűtésre, **néhány kiemelkedő fontosságú kritériumot** kell meghatározni (Dong et al., 2007):

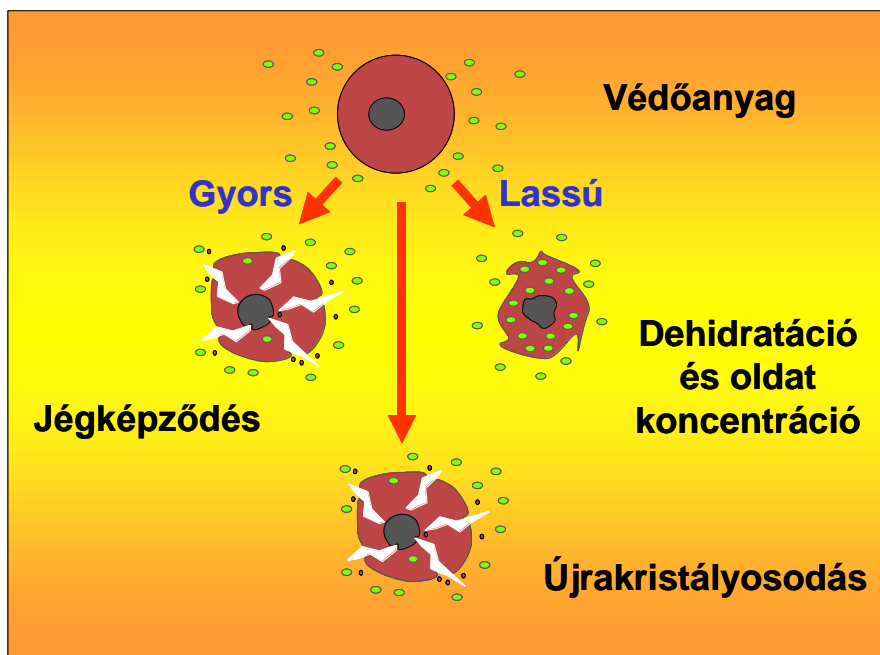
- tudatában kell lenni azon ténynek, hogy különböző halfajokon végzett munkát kívánjuk egységesíteni,
- koncentrálni kell az egyszerűsége, könnyen reprodukálható módszereket szükséges alkalmazni,
- általános technológia kialakítására van igény, mely a fejlettebb gerinces haszonállatok génbanki infrastruktúrájához hasonló, vagy oda beépíthető,
- a mélyhűtött sperma felhasználása széleskörű, mely igényeket figyelembe kell venni,
- csökkenteni kell az eltérő technikákból adódó akadályokat a kereskedelem és felhasználás élénkítéséhez, és a gyakorlati elfogadáshoz.

A 10. sz. ábra mutatja be az **ivarsejt mélyhűtés jelentősebb kritikus pontjait**, melyek biológiai értelemben is, valamint technológiai, gaméta minőségi és adatbázis szintű kritikus pontokként egyaránt értelmezhetőek.



10. sz. ábra: Az ivarsejt mélyhűtés kritikus pontjai és folyamatainak összefüggése (Tiersch et al., 2007 nyomán)

A mélyhűtés során, mind a fagyasztásnál, mind a felolvasztásnál, a technológia alkalmazása során **több veszély fennáll**, ami befolyásolhatja az ivarsejtek minőségét (11. sz. ábra). Ezek a veszélyek azonban nem csak a két fő technológiai lépésnél jelentkezhetnek, hanem tárolás alatt, vagy szállítás közben is bekövetkezhetnek (Yang et al., 2007).



11. sz. ábra: A mélyhűtés kriobiológiai alapjai és a lehetséges anomáliák (Yang et al., 2007 nyomán)

A biológiai károsodás mellett fontos érzékelni az egyes **technológiai lépések során bekövetkező hibák okozta veszélyeket** is (12. sz. ábra). Ezen információk tudatában kell oly módon meghatározni és kialakítani az egyes

technológiai lépéseket, hogy azok minimalizálni tudják ezen hibaforrások előfordulását és elkövetését (Tiersch et al., 2007).



12. sz. ábra: Az egyes technológiai lépések során előforduló károsodások lehetséges formái (Tiersch et al., 2007 nyomán)

A módszer egységesítését nehezíti azon többféle változó és alkalmazható technika, melyeknek további kiemelt hatása van a mélyhűtés sikerességére (1. sz. táblázat). Ezek alapvetően döntéseket feltételeznek, és az abból fakadó eredményeket vagy eredménytelenséget vonják maguk után.

1. sz. táblázat: A mélyhűtés során alkalmazható technikai változók

Változó megnevezése	Alternatívák			
Hűtő eszköz	műszalma	üveg fiola	műanyagcső	
Védőanyag	DMSO	metanol	glicerin	DMA
Hűtési sebesség	4 °C/perc		40 °C/perc	
Hűtő berendezés	polisztirol doboz		programozható hűtőberendezés	
Felolvasztás	4 °C	25 °C	40 °C	

A fentiek alapján megállapítható, hogy a mélyhűtésnek, mint egységesíthető biotechnikai eljárásnak **számos kihívással kell megküzdenie**, a standardizálási törekvések mind a kutatói közeg, mind a felhasználók felől igényként jelentkeznek, melyek megoldása tudatos munkával, lépésről lépésre megoldhatóvá válnak.

2.5.2. Spermamélyhűtés alkalmazása a halgazdálkodásban

A mélyhűtésben elért sikerek ellenére, jelenleg nincs piaca a mélyhűtött sperma alkalmazásának a halgazdálkodásban (Dong et al., 2007). A gyakorlati alkalmazás, illetve szaporítási technológia sorába történő beépítésre alig található utalás. Kivételt

képez ez alól a génbanki alkalmazás, melynek célja alapvetően védett halfajok vagy értékes genetikai anyag megőrzésére irányul. Ebben az esetben nem szükséges, hogy a mélyhűtés technológiája kereskedelmi szempontból is kifizetődő legyen (pl. nem szükséges, hogy a mélyhűtés hatékonysága megegyezzen a bevált mesterséges szaporítási módszerekkel). Ilyen génbanki alkalmazásra került sor egy **Moszkva melletti génbankban**, ahol több, mint 900 adag különböző pontyfajtától származó spermát tárolnak, és a kutatások szerint az 5 éves tárolás nem csökkentette termékenyítőképességüket (Katassonov et al., 1995). Hazánkban a Halászati és Öntözési Kutatóintézet (HAKI) és a SZIE közös együttműködésében a HAKI élő ponty génbankjának felhasználásával hoztak létre kutatók **mélyhűtött spermabankot**. A munka során 187 egyed (15 hazai és 3 külföldi fajta) spermáját hűtötték 0,5 ml-es műszalmákban (Horváth, 2007). A **pontylazacfélék** közé tartozó, veszélyeztetett *Brycon orbignyanus* spermájának mélyhűtésére Maria et al. (2006) dolgoztak ki sikeres eljárást, melynek segítségével génbankot kívánnak létrehozni.

A gyakorlati alkalmazás egyik fontos eleme az üzemi méretű technológia kialakítása. A gyakorlati technológiának két fontos pillére van: nagy mennyiségű ikrát lehessen termékenyíteni egy adag mélyhűtött spermával, illetve relative nagy mennyiségű (4-5 ml) spermát lehessen egy műszalmában mélyhűteni.

Lubzens et al. (1997) vizsgálatai során 1 ml (kb. 1000 ikraszem) és 100 ml (kb. 100 000 db ikraszem) ikra termékenyülése közötti különbségeket vizsgáltak **ponty** esetében. Az első esetben $33\pm 24\%$, míg a második esetben $14\pm 16\%$ volt a termékenyülés, szemben a kontroll értékkel ($70\pm 15\%$). Ezt követően azonos ikramennyiséget (0,2 ml) termékenyítettek 4, 20 és 200 μ l mélyhűtött, majd felolvasztott spermával. Míg a sperma mennyiségét 50-szeresére növelték, addig a termékenyülés csak 2,35-szörösére nőtt.

A laborkísérletek során használatos (0,25; 0,5; 1 ml) méretű műszalmák helyett a gyakorlatban az üzemi ikratételek (100-300 g) megtermékenyítéséhez elegendő hímivarsejttel tartalmazó 4-5 ml-es műszalmákra lenne szükség. A nagy méret azonban hátrányokkal is jár (pl. a hűtés során a nagy méret miatt nem egyenletes a fagyás a teljes térfogatban), ami a sperma minőségének romlásához vezethet, ezért szükséges az egyes mélyhűtési technológiákat a nagyméretű műszalmák esetében is tesztelni, fejleszteni. Erre végeztek már kísérleteket, igaz változó sikerességgel. Wheeler és Thorgaard (1991) 4,5 ml-es műszalmában, szárazjégen fagyasztottak **szivárványos pisztráng** spermát. A mintákat 5°C-os vízfürdőben olvasztották fel. Ezzel a módszerrel a kontrollhoz képest 49%-os termékenyülést értek el, amikor 700 ikrát termékenyítettek egy szalmával. Brown és Mims (1999) szintén szárazjégen hűtöttek **lapátorrú tok** (*Polyodon spathula*) spermát 5 ml-es műszalmában. A minták motilitása a kontroll 100%-hoz képest 50-25%-ra csökkent a felolvasztást követően. A kelési százalék szignifikánsan alacsonyabb volt mélyhűtött sperma esetében ($16\pm 2\%$) a kontroll eredményekhez ($91\pm 2\%$) képest. Silveira-Ninhaus et al. (2006) nem találtak szignifikáns különbséget a **0,5 ml és a 4 ml-es műszalmában** mélyhűtött sperma használata között a kelési százalék vonatkozásában a *Brycon cephalus* faj esetében, annak ellenére, hogy a 0,5 ml-es műszalmákban némileg jobb eredményeket kaptak. Horváth et al. (2007) azt találták, hogy amennyiben $5,917\times 10^5$ db spermiumnál kevesebb jut egy ikraszemre ponty esetében, akkor **nem ajánlott** a termékenyítés során **5 ml-es műszalmában** hűtött hím ivarterméket használni.

Cabrita et al. (2001) a hőmérsékleti viszonyokat vizsgálták különböző méretű műszalmák használatakor (0,5; 1,8; 5 ml) továbbá termékenyítési próbákat is végeztek. A hűtési és felolvasztási sebességet nagyon hasonlóan találták az 1,8 és a 0,5 ml-es műszalmák esetében. Az 5 ml-es műszalma viszont lassabb hűtési és

olvasztási sebességet eredményezett. A motilitás eredmények tekintetében a kutatók mindhárom esetben hasonló értékeket figyeltek meg. Az első termékenyítési kísérlet során 100, 240 és 400 ikraszemet termékenyítettek 0,5 ml, 1,8 ml és 5 ml-es műszalma tartalmával. A legjobb eredményt a 0,5 ml-es, majd az 1,8 ml-es műszalma adta. A második kísérlet során 150 ml (1600-2000 db ikraszem) ikrát termékenyítettek **2 db 5 ml-es műszalma tartalmával**. Az eredmény megegyezett a kontroll eredményeivel. A szerzők a kapott eredmények tükrében alkalmasnak találták a nagy méretű műszalmákat keltetőházi célokra. Lahnsteiner et al. (2002) egy **új eljárást teszteltek**, mely során 500 g szívárványos pisztráng ikrát termékenyítettek 12 db 1,2 ml-es műszalma tartalmával. Az új eljárás szerint a 12 szalmát saját készítésű rugalmas, műanyag hevederbe helyezték, amelyben a szalmák számára egyenként alakítottak ki helyeket. Ezt követően megtöltötték a szalmákat és az egész csomagot egyszerre hűtötték le. Mivel a hevederek a cseppfolyós nitrogénben is rugalmasak maradtak, azokat a kaniszeres tárolás céljára fel lehetett göngyölni. Felolvasztáskor a hevedereket kiengedték és meleg vízfürdőben olvasztották fel. Ezt követően a műszalmákat az ikratétel fölé helyezték, elvágták és összekeverték az ikrával. A termékenyülés $87\pm 2\%$ lett mélyhűtött sperma, és szintén $87\pm 2\%$ friss sperma esetében. A szerzők szerint csak a száraz termékenyítési technika eredményez magas termékenyülési arányt nagy mennyiségű ikratételek mélyhűtött spermával történő termékenyítése esetén.

A **nagy rombuszhal** esetében Chen et al. (2004) dolgoztak ki olyan mélyhűtési eljárást, mely során a spermát 1,8 ml-es krio-csövekben hűtötték és a kontrollal megegyező termékenyülési és kelési eredményt kaptak. Ezek alapján a szerzők alkalmasnak találták a módszert keltetőházi célokra.

Fehér busa (*Hypophthalmichthys molitrix*) esetében 50 ml ikrát (kb. 60 000 db ikraszem) termékenyítettek Alvarez et al. (2003) 1,8 ml-es műszalmák tartalmával, melyek 1,5 ml hígított szeminális folyadékot tartalmaztak, keltetőházi körülmények között. Nem találtak szignifikáns különbséget a mélyhűtött és friss sperma kelési eredményei között. Leírásuk szerint mélyhűtött sperma segítségével 38 400 000 db fehér busa lárvát állítottak elő egy kubai halgazdaságban 1999. november és 2000. március között, amikor friss sperma nem állt rendelkezésre. Véleményük szerint a mélyhűtés csökkentheti a szükséges hímek számát, minimalizálhatja a kezelés okozta stresszt a fejési alkalmak csökkenése miatt és elősegíti a mesterséges termékenyítést, amikor az ikra rendelkezésre áll.

2.5.3. Mélyhűtésből származó ivadék életképesség vizsgálatának eddigi eredményei

A nagyszámú mélyhűtéssel foglalkozó irodalom ellenére napjainkig **kevés rendelkezésre álló közlemény található** a mélyhűtésből származó ivadékok életképességével, a megmaradásával és növekedésével kapcsolatosan.

Azonban a mélyhűtésből származó lárvák vitalitásának vizsgálata **két okból** lehet fontos. Ki kell zárni a vizsgálatokkal az esetleges mélyhűtés okozta genetikai és az ebből fakadó szervi torzulások lehetőségét, továbbá szükségesnek tartom a gyakorlati szakemberek mélyhűtés szembeni hiedelmeit eloszlatni.

Az egyik legkorábbi munkában a **csíkos sügér** (*Morone saxatilis*) vizsgálták amerikai kutatók a spermamélyhűtésből származó lárvák növekedését és túlélését (Kerby et al., 1985). A kísérlet során a lárvákat 5-6 napig keltetőházban tartották a tavakba történő kihelyezést megelőzően. Az első, illetve második kísérletben 6-6 db 0,4 ha-os és 0,2 ha-os tavat használtak. Az egyes tavakat 5-6 napos lárvával 3-3

ismétlésben (kezelt-kontroll) 500 000 lárva/ha sűrűségben népesítették. A tavakat 47 (1. kísérlet) és 43 (2. kísérlet) nappal a kihelyezést követően lecsapolták, majd lehalászták. Összehasonlítva a kezelt és kontroll lárvákat, sem a lehalászott egyedszámban és tömegben, sem a megmaradásban nem találtak szignifikáns különbségeket, habár, a mélyhűtött spermából származó lárvák mérete szignifikánsan nagyobb volt a friss spermából származó lárvákénál. Az egyedileg lemért 1988 db kezelt lárvából mindössze 5 db, míg 1970 db kontroll egyedből 7 db volt torz. A 12 db-ból 10 egyednek volt enyhén rövidebb felső állkapcsa és 2 az átlagnál nagyobb fejfelülettel rendelkezett.

Ehhez hasonló eredményeket kapott Rana és McAndrew (1989) is **tilápia fajok** (*Oreochromis spp.*) esetében. Ebben az esetben 30 l-es kádakból álló recirkulációs rendszerbe helyezték az elúszó lárvákat, majd 30 napos korban egyesével mérték le őket. A kísérletben vizsgálták a mélyhűtött sperma tárolási idejének hatását is a lárvák túlélésére. A 30 napos ivadék növekedése és túlélése nem különbözött szignifikánsan a kontroll egyedek paramétereitől.

Tiersch et al. (1994) **csatornaharcsán** végeztek megmaradási kísérletet. Az 5 nap alatt kikelt lárvákat a szikhólyag felszívódását követően, az exogén táplálkozás kezdetének időpontjában 80 l-es, majd 4 hónapos korban 160 l-es, végül 9 hónapos korban 800 l-es kádakba helyezték át. A nevelés elején megfelelő méretű, 49% fehérjetartalmú, süllýedő táppal, majd a nevelés végén 35%-os fehérjetartalmú lebegő táppal etették a lárvákat. Minden hónapban 25 egyed tömegét mérték le. Az egy éven keresztül havonta mért tömeg nem tért el szignifikánsan a mélyhűtött és friss spermából származó lárvák esetében.

A **nagy rombuszhal** (*Psetta maxima*) spermájának esetében is többször vizsgálták a mélyhűtés hatását a lárvák túlélésére. Az előző kísérlethez hasonlóan medencében tartották az egyedeket a nevelés során, és a mélyhűtött spermából származó, 10 napos lárva tömege és megmaradása nem különbözött szignifikánsan a kontroll egyedekétől (Suquet et al., 1998). Ezzel ellentétben Chereguini et al. (2001) már találtak eltérést a mélyhűtött, illetve friss spermából származó lárvák vizsgálata során. A szerzők 31 napig neveltek 4 különböző szaporításból származó lárvákat, melyek növekedési paramétereit a 0, 7, 14 és 31. napon mérték. A lárvák hosszában és nedves tömegében nem találtak szignifikáns különbséget a 0, 7 és 14. napokon. A 31. napon azonban, két esetben szignifikáns volt az eltérés a mélyhűtött, illetve a friss spermából származó lárvák tömegében, a négy csoportból az egyikben a kezelt, míg a másikban a kontroll egyedek mutattak jobb eredményt. A munka során azonban nem volt szabályszerű különbség az egyes csoportok között, így a talált eltéréseket a szerzők az egyedi hatásoknak, illetve a különböző szaporítási kísérletek által okozott varianciának tulajdonították.

Egy későbbi munka során ugyanez a kutatócsoport már **4 hónapos rombuszhal** ivadékot vetett összehasonlító vizsgálat alá egy éven keresztül. Az eredmények szerint a kezelt és kontroll egyedek növekedés regressziós egyenesének meredeksége nem mutatott különbséget (Chereguini et al. 2002), hasonlóan a legrégebbi összehasonlító vizsgálatához, melyben Moczariski (1977) 1 éves korig vizsgálta a mélyhűtött, illetve friss spermából származó **ponty ivadékok** növekedését.

Szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) esetében 4-9 hónapon keresztül vizsgálták a mélyhűtött és normál spermából származó ivadék tulajdonságait (Hayes et al., 2005). Az 1996-os kísérlet során a két csoportot külön kádakban, 130 napig nevelték, intenzívebb takarmányozás mellett, és a vizsgálatokban nem volt kimutatható szignifikáns különbség a megmaradás, a testhossz vagy a testtömeg

tekintetében. Ezzel ellentétben a második kísérletben a két csoportot azonos kádakban nevelték, alacsonyabb táplálási intenzitás mellett (kompetíciót előidézve) 210 napon át. Ennek eredményeképpen a megmaradás azonos mértékű volt, míg a kontroll egyedek hossza 4%-al, az átlagtömege pedig 15%-al nagyobb volt a mélyhűtésből származó lárvák paramétereinél. Az 1997-ben elvégzett harmadik kísérletben a második kísérletet ismételték meg, 313 napos neveléssel. Sem megmaradásban, sem tömegben, sem pedig hosszban nem találtak eltérést a két csoport között. Az eddigi szakirodalomtól eltérően az 1996-os kísérletben megvizsgálták a kezelt és kontroll egyedek stresszre és betegségekre adott reakciói közötti eltéréseket is. Az ivadékok akut stressz hatására mért kortizol szintjében nem volt szignifikáns különbség a két csoport között, míg a 48 órás stressz hatására mért kortizol szint szignifikánsan magasabb volt a friss spermából származó csoportban. A háromféle dózisban *Listonella anguillarum* baktériummal fertőzött egyedekben nem volt szignifikáns különbség a mortalitási %-ot tekintve a mélyhűtött és friss spermából származó ivadékok csoportjai között.

Egy **indiai pontyfélé**, a *Tor khudree* esetében sem találtak a kutatók szignifikáns különbséget a 15 napig nevelt, mélyhűtött spermából származó lárvák morfológiájában a kontroll egyedekhez képest (Basavaraja et al., 2002). A kísérlet során azonban megvizsgálták a lárvák megmaradásának és a különböző egyensúlyi időkhöz az összefüggéseit 3 különböző DMSO védőanyag koncentráció használatakor. A legmagasabb túlélési rátát (75%, kontroll: 77%) 15%-os DMSO védőanyag és 30 perces egyensúlyi idő alkalmazása mellett mutatták ki a kutatók.

A **brazíliai lepényhalat** (*Paralichthys orbignyanus*) vizsgálva Lanes et al. (2008) sem találtak különbséget a mélyhűtött és friss spermából származó lárvák életképessége között. A kutatók vizsgálták továbbá a két csoportból származó lárvák között található torz egyedek számát is, azonban hasonlóan a téli lepényhalon (*Pseudopleuronectes americanus*) (Rideout et al., 2003) és afrikai harcsán (*Clarias gariepinus*) (Miskolczi et al., 2005) korábban végzett vizsgálatok eredményéhez, szignifikáns különbséget nem találtak.

Bokor et al., (2010) kutatásai során, mely a **harcsa** spermahűtésre fókuszált, megvizsgálta, hogy a mélyhűtésből, illetve a friss spermából származó lárvák megmaradása és növekedése miben különbözik egymástól. A vizsgálatokat mind a **nem táplálkozó**, mind a **táplálkozó lárvák**on elvégezte. A második esetben a vizsgálatokat üzemi körülmények között is vizsgálta. Az eredmények szerint a **mélyhűtésből származó lárvák megmaradása megegyezik**, míg a **növekedése bizonyos esetekben felülmúlja** a natív spermából származó, kontroll egyedek megmaradását, illetve növekedését. A vizsgálat eredményei megcáfolják a gyakorlati szakemberek mélyhűtés iránti hiedelmeit.

2.6. A halsperma mélyhűtés eddigi eredményei és problémái rendszertani csoportok szerint

Általánosságban megállapítható, hogy az egyes rendszertani csoportokhoz tartozó fajok esetén használt módszerek **sok közös jellemzőt tartalmaznak**, ezért indokolt, hogy az elért eredményeket és a fennmaradó problémákat is rendszertani csoportonként tárgyaljam. A szakirodalomban a pisztrángfélék spermamélyhűtését tanulmányozták a legtöbben, azonban ezzel a rendszertani csoporttal külön nem foglalkozom, mivel az ide tartozó fajok ivarsejtjei nem képezték vizsgálataim tárgyát.

2.6.1. Tokfélék

A tokfélék spermájának mélyhűtése egészen a hatvanas évekig nyúlik vissza, azonban igazán megelégedésre szolgáló módszert azóta sem sikerült találni. A publikációk nagy része orosz nyelven jelent meg, ami a nyugati kutatók számára nehezen volt elérhető, a kelet- és közép-európai országok pedig – ahol ez az irodalom rendelkezésre állt – sokáig nem érdeklődtek ez iránt a technológia iránt. Az első próbálkozást Burcev és Szerebrjakova közölték 1969-ben, akik **viza** (*Huso huso*) és **amuri viza** (*H. dauricus*) spermáját hűtötték szacharózt, tojássárgáját és glicerint tartalmazó hűtőmediumban, amivel 100% körüli motilitást, de igen alacsony termékenyülést értek el. Később Kasimov et al. (1974) és Pushkar et al. (1978) végeztek kísérleteket **vágótok** (*Acipenser gueldenstaedti*) és **sőregtok** (*A. stellatus*) spermáján és átlagosan 35%, illetve 70%-os termékenyülést kaptak. Drokin et al. (1991) a veszélyeztetett **szahalini tok** (*A. medirostris*) spermáját hűtötték 20 mM Tris-HCl puffer és 12% DMSO használatával. Jelentésük szerint a spermiumok 20%-a élte túl a hűtést. Cherepanov et al. (1993) **több faj spermáját** vizsgálva 10 és 90% közötti felolvasztás utáni motilitást kaptak, de nem közöltek termékenyülési eredményeket. A módszertani leírásuk sajnos kevés információt tartalmazott, mindössze annyit közöltek, hogy Tris-HCl puffert és DMSO-t használtak. Az első igazán jól használható módszert Tsvetkova et al. közölték 1996-ban, akik **kecsege** (*A. ruthenus*) és **lénai tok** (*A. baeri*) spermáján dolgoztak. A hűtést 23,4 mM szacharóz, 118 mM Tris (pH 8,0) összetételű hígítóval és 20% tojássárgáját, valamint 15% DMSO-t tartalmazó védőanyag-keverékkel végezték, aminek eredményeként lénai toknál 53%, kecsegenél pedig 23% termékenyülést értek el. Jähnichen et al. (1999) egy igen egyszerű, de hatékony módszert dolgoztak ki a **kecsege** spermájának mélyhűtésére. Hígítóként 25 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris (pH 8,5) oldatot használtak, amelyhez 12,5 illetve 17,5% etilénlikol védőanyagot adtak. A spermát programozható hűtőgépben fagyasztották le, és 44-94%-os kelést (a kontrollt véve 100%-nak) értek el a felolvasztott spermával. Sajnos nem közölték, hogy melyik védőanyag-koncentráció bizonyult a legjobbnak.

Függetlenül a publikált sikeres mélyhűtési módszerektől a tokfélék spermájának fagyasztásánál egy általános probléma jelenleg is fennáll: a mélyhűtött sperma a felolvasztás után nagyon jó motilitást mutat, azonban vagy egyáltalán nem termékenyít, vagy csak nagyon gyenge termékenyülési eredmények születnek. A **lapátorru tok** (*Polyodon spathula*) spermáját mélyhűtve Mims et al. (2000) a kontrollhoz (90±3%) képest igen gyenge kelést értek el a felolvasztott spermával termékenyítve (16±2%). Megfigyelésük szerint a spermiumok akroszóma membránja sérül, ami spontán akroszómareakcióhoz vezet és megakadályozza a termékenyülést. Billard et al. (2000) a **lénai tok** spermájának mozgását vizsgálták friss és mélyhűtött majd felolvasztott hímivarsejteken. Azt figyelték meg, hogy a felolvasztott sejtek mozgása lassúbb, mint a kezeletlen sejteké, és a farki régió gömbölyű képződmények keletkeztek meg, melyek hiányoztak a frissen fejt hím ivartermék sejteiről.

Az első jelentős áttörést a tokfélék spermájának mélyhűtésében Glogowski et al. (2002) **lénai tok** fajban kapott eredményei jelentették, akik három hígító hatását hasonlították össze 10% metanol védőanyag jelenlétében és azt találták, hogy a 23,4 mM szacharóz; 30 mM Tris; 0,25 mM KCl (pH 8,0) összetételű hígítóval mélyhűtött sperma használata a kontrollal megegyező termékenyülési és kelési eredményeket eredményezett. Ugyanezt a hígítót és védőanyagot hasonlították össze más hűtőmediumokkal (pl. DMSO védőanyaggal és hiperozmotikus hígítókkal) Horváth et

al. (2005) **két amerikai tokfaj**, az *Acipenser brevirostrum* és a *Scaphirhynchus albus* spermáját mélyhűtve. Minden esetben a metanol védőanyag jelenlétében hűtött mintákkal magasabb termékenyülési és kelési eredményeket értek el, mint DMSO védőanyag használatakor. Eredményeiket összegezve arra a következtetésre jutottak, hogy a mélyhűtött spermával végzett sikeres termékenyítés fő feltétele az, hogy a hűtőmédiум ozmolalitása megegyezzen a spermáéval, azaz 80 mOsmol körülnek kell lennie. Ezeket a megfigyeléseiket később **lapátorru tok** spermáját mélyhűtve is megerősítették (Horváth et al., 2006). A **kecsege** (*Acipenser ruthenus*) spermáját mélyhűtve metanol és DMSO védőanyagok jelenlétében Psenicka et al. (2008) azt tapasztalták, hogy DMSO védőanyag használata mellett a mélyhűtés spontán akroszómareakciót vált ki, ami szintén magyarázat lehet az ezzel a védőanyaggal hűtött minták alacsony termékenyítő képességére.

2.6.2. Pontyfélék

A **ponty** (*Cyprinus carpio*) spermamélyhűtése szintén igen kiterjedt irodalommal rendelkezik. Az első próbálkozások még a „hőskorra” tekintenek vissza, amikor is Sneed és Clemens (1956) ponty és aranyhal spermán végzett el vizsgálatokat. Ringer-oldatot alkalmazva, 6-12% glicerín krioprotektánnal kombinálva fagyasztották a spermát -73 °C-ig, és 60 óra múlva a sejtek kevesebb, mint 20%-a aktiválódott. Termékenyülési kísérleteket nem végeztek. Az **első hazai próbálkozás** Litkei nevéhez fűződik (1976), aki műszalmában, üveggémcsőben és lezárható műanyag centrifugacsőben végezte a hűtést, folyékony nitrogénben. Hígító összetétele az alábbi volt: 0,4 g NaCl, 0,8 g Na-citrát, védőanyag: 2,05 g glükóz. A termékenyítés során 15,6%-os termékenyülést realizált. Az első eredményes mélyhűtést követően Moczarski (akivel Litkei személyes konzultált a kísérletei előtt és alatt) **publikált hivatalos folyóiratban** sikeres spermamélyhűtést 1977-ben. 10-15 %-os DMSO-t alkalmazva 6-12 %-os felolvasztás utáni motilitást és 10-12 %-os termékenyülést ért el. **Fontos előrelépést jelentettek** Kurokura et al. (1984) vizsgálatai, akik meghatározták a ponty szemínális folyadékának összetételét, és ennek segítségével állítottak össze egy hígítót, valamint ők alkalmaztak először **alumínium tasakot** mélyhűtés céljából, ami a nagymennyiségű sperma lehűtését teszi lényegesen egyszerűbbé. Koldras és Bieniarz 1987-ben **ampullákban** végeztek hűtést folyékony nitrogén gőzében. Cognie et al. vizsgálatai 1989-ben 10 % DMSO védőanyaggal programozható mélyhűtéssel igen gyenge eredményt hoztak. Lubzens et al. 1993-ban először hűtött koi pontyspermát. Magyary et al. (1996a,b) **megnövelt K+-tartalommal** módosították a Kurokura-féle hígítót, a termékenyítés során optimalizálták a sperma-ikra, valamint az ikra-víz arányt, és **új termékenyítési módszert** alkalmaztak. Az **eddig legjobb eredmény** Lin et al. (1992) nevéhez fűződik, akik 10-12 % DMSO alkalmazásával 92 %-os termékenyülést értek el. A **pellet-módszert** és a DMA-t, mint védőanyagot sikerrel alkalmazta Babiak et al. (1997), aki egy saját összeállítású hígítóval és 10% DMA védőanyaggal hűtve a spermát 73% szemfoltos stádiumú termékenyülést és 61% elúszó lárvát kapott.

A **többi pontyfélé** faj spermájának mélyhűtésére **lényegesen kevesebb figyelmet fordítottak**, mint a pontyéra. A növényevő fajok közül az **amur** (*Ctenopharyngodon idella*) spermáját Durbin et al. (1982) hűtötte 0,73% NaCl, 0,75% NaHCO₃ és 10% DMSO használatával, és egyéves tárolás után 57 %-os termékenyülést ért el. Az amur, **fekete amur** (*Mylopharyngodon piceus*) és a **fehér busa** (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermáját hűtötte Zhang és Liu (1992), és 80-92% körüli termékenyülést ért el. Hűtőmédiумként 0,3% NaCl, 6% glükóz, 0,05%

NaHCO₃ összetételű hígítót és 10% DMSO védőanyagot használtak. Az **aranyhal** (*Carassius auratus*) spermamélyhűtéséről Bercsényi et al. (1998) adtak jelentést először, akik a Magyary et al. (1996a,b) által pontyra kidolgozott módszert alkalmazták az aranyhalra. A pontyfélék spermamélyhűtésének máig fennálló problémája a nem kielégítő felolvasztás utáni motilitás és a kontrolltól elmaradó termékenyülés.

2.6.3. Harcsaalakúak

A harcsaalakúak rendjébe (*Siluriformes*) tartozó több ezer faj közül eddig csak néhány gazdasági jelentőséggel is rendelkező faj spermájára dolgoztak ki mélyhűtési eljárást.

A **szürke harcsa** (*Silurus glanis*) spermáját először magyar kutatók, Krasznai és Márián (1985) hűtötték eredményesen. Hígítóként Alsever-oldatot, védőanyagként 15 % DMSO-t használva 1:5 hígítási arány és 10 °C/perc hűtési sebesség mellett 90 %-os termékenyülést és 85 %-os kelést értek el.

Linhart et al. 1993-ban Saad et al. féle **immobilizáló oldatot** alkalmazva folyékony nitrogén gőzében alumíniumlemezen végeztek hűtést. A munka során a spermát egy aktivációt gátló oldatba (200 mM NaCl, 30 mM Tris, pH 7) fejték. Az **első kísérlet során** ezt az elegyet különböző koncentrációjú glicerinnel (5, 10, 20, 30, 40 és 50 %), DMSO (5, 10, 20, 30%) vagy etilén-glikollal keverték. Az így hígított mintákat egyensúlyozási idő nélkül 40 µl-es adagokban alumínium lemezre cseppentették, mely 4 mm magasságban úszott a folyékony nitrogén felszínétől a nitrogén gőzben, majd 10 perccel később a mintákat a folyékony nitrogénbe helyezték. Felolvasztás során a pelleteteket egy 5 ml-es kémcsőbe tették hígítás nélkül, majd kézzel melegítve 10 másodpercig rázták őket. A **második kísérletben** tesztelték a hűtési sebességet és a felolvasztás közegét. A kis alumínium lemezeket nyitott polisztirol dobozban lévő folyékony nitrogén felszínétől 2 mm-re (-80°C -tól -85°C -ig), 4 mm-re (-70°C-tól -75°C-ig) és 20 mm-re (-50°C-tól -55°C-ig) úsztatták, illetve közvetlenül a nitrogén felszínére (-100°C-tól -105°C-ig) helyezték a mintákat. Védőanyagként glicerint használtak. A felolvasztást 30°C-on végezték 10 másodpercig, aktivációt gátló oldattal, ill. oldat nélkül. A **harmadik kísérlet** során termékenyítési teszteket végeztek. A friss spermát, az aktivációt gátló oldatot és a 12%-os glicerint összekeverték, majd alumínium lemezen 5 ml-es pelletekben hűtötték (-80°C-tól -85°C-ig terjedő hőmérsékleten) 10 percen át, majd folyékony nitrogénbe helyezték a mintákat. Felolvasztáskor a minta felét (2,5 ml) üveg kémcsőbe helyezték és 30°C-on 20 másodpercig olvasztották. Ezt követően 25 ml desztillált vízzel hígították és 80 g ikrához keverték. Az első kísérlet értékelésekor a mélyhűtést megelőzően 10 %-os glicerinnel és 10%-os DMSO eredményezte a legmagasabb motilitás értékeket. A mélyhűtést követően 13-36% motilitást figyeltek meg 10-30 %-os glicerinnel. DMSO esetében nem találtak mozgó sejteket a hűtést követően. Már a hűtést megelőzően megszűnt a spermiumok mozgása az etilén-glikol toxicitása miatt. A második kísérlet során azt kapták a kutatók, hogy az optimális hűtési magasság 2 mm a folyékony nitrogén felszínétől. A termékenyítési kísérlet során a termékenyülési arány 42,3 és 48,1 % között volt (átlag 45,2%, míg a kontroll érték 64 és 74,8% (átlag 70,6%). A két eredmény között szignifikáns különbség nem volt. A mélyhűtésből származó embriók 52,3%-a, míg a kontroll embriók 31,5% (nem volt szignifikáns különbség) deformált volt.

Később ismét Linhart et al. (2005) foglalkozott a harcsa sperma mélyhűtésével. A hűtést több lépcsőben **programozható hűtőberendezés** (PLANER Kryo 10 series

III) segítségével végeztek: + 4°C-ról -9°C-ra 4 °C/perc sebességgel, -9°C-ról -80°C-ra 11 °C/perc sebességgel, majd -80°C-on 6 percig állni hagyták a mintákat, mielőtt azok folyékony nitrogénbe kerültek. A felolvasztást 40°C-on 105 másodpercig végezték. Az első kísérlet során 3 védőanyag (8, 10, 12%-os DMSO, 5, 7,5 10%-os metanol, 8, 10, 12%, 1:1 arányú DMSO és propándiol elegye) különböző koncentrációját és kombinációját vizsgálták 2 tárolási idő (1 és 5 óra) mellett. A mintákat **1,8 ml-es kriocsövekben** hűtötték. A második kísérlet során 3 egyensúlyi időt teszteltek. Az 5 órán keresztül tárolt hígított spermához 10 % DMSO-t adagoltak, majd 0, 5 és 20 percig jégen egyensúlyt állítottak a mintákat, a mélyhűtést megelőzően. A harmadik kísérletben 3 különböző méretű kriocsövet teszteltek. Egy ml mintát töltöttek 1 és 1,8 ml-es, illetve 4 ml mintát 4 ml-es kriocsövekbe. A legjobb kelési eredményt (82-86%) a DMSO (8, 10, 12%), illetve az 5% DMSO és 5% propándiol elegye mellett az 5 órás tárolás esetében figyelték meg. Ezek az eredmények nem különböztek szignifikánsan a kontroll eredményektől. A legmagasabb kelési arányt a kontroll és az 5 percen keresztül egyensúlyt állított minták esetében kapták. Az egyensúlyi időnek nem volt szignifikáns hatása a sperma mozgására és a felolvasztást követő motilitásra. A kelési eredmény jobb volt abban az esetben, amikor 1 és 1,8 ml-es méretű krio-csöveket használtak. Az élő spermiumok aránya azonban szignifikánsan magasabb volt az 1,8 és 4 ml-es minták esetében az 1 ml-es mérethez képest.

Ogier de Baulny et al. (2008) is leírtak egy módszert, mely alkalmas a harcsasperma mélyhűtésére. A kipréselt **spermazuszipenziót** 4 °C-on, 20 percig, 200 g-n **centrifugálták**, és a centrifugálást követően kiülepedett sperma 9×10^9 spermiumot tartalmazott milliliterenként. A spermát 1:3 arányban hígították Cryo-Fish™ védőanyaggal (ref 017295, IMV technologies, L'aigle, Franciaország). A védőanyagot 0,8-ad rész cryofish puffer, 0,1 rész tojássárgája és 0,1 rész DMA összekeverésével állították elő. Ezt követően az elegyet 0,5 ml-es műszalmákba töltötték, majd a 4 °C-os 10 perces egyensúlyi időt követően hűtötték egy, a folyékony nitrogén felszínén úszó 3-4 cm-es kereten. A műszalmákat 10 perc múlva nitrogénbe helyezték. A felolvasztás során 37 °C-os vízfürdőt használtak 10 másodpercig. Javasolják a spermát 2-3 perccel a felolvasztást követően felhasználni. A leírása alapján érdemes 10-szer annyi mélyhűtött spermát használni termékenyítéshez, mint amennyi friss spermából használatos.

Az **afrikai harcsa** (*Clarias gariepinus*) spermamélyhűtésével először a dél-afrikai Steyn et al. (1985) foglalkoztak. 5 % glükóz hígító és 5 % glicerín védőanyag alkalmazásával 50 %-os felolvasztás utáni motilitást értek el.

Steyn és Van Vuren 1987-ben végezték az első termékenyítési kísérleteket, amikor 5 % glükóz hígítóval és 11 %-os glicerín és DMSO védőanyaggal a kontrollal megegyező kelést kaptak. Steyn 1993-ban a hűtési sebességet 5 °C/percben optimalizálta.

Van der Walt et al. (1993) célja az volt, hogy meghatározza a spermamélyhűtés hatását a lárvák túlélésére, az előzetes elektroforézis eredményei alapján szelektált szülőktől származó, mesterséges termékenyítéssel létrehozott afrikai harcsák specifikus biokémiai fenotípus gyakoriságára és az F1 generáció növekedésére. A szerzők szerint a mélyhűtést fel lehet használni az elektroforézis eredményeivel együtt a tenyésztett állományok életképességének növelésére éppúgy, mint természetes populációk genetikai variabilitásának megőrzésére.

Viveiros et al. (2000) 5-25 % közötti koncentrációban DMSO-t és metanolt teszteltek védőanyagként, a szeminális folyadékot Ginzburg-féle ringer oldatban hígították, a hűtést pedig 1 ml-es kriocsövekben végezték programozható hűtő berendezés segítségével. Az **egységnyi ikrára jutó spermium felesleg elkerülése**

végezték a felolvasztott spermát 1:20, 1:200 és 1:2000 arányban hígították a termékenyítést megelőzően. A kísérlet végeztével a legjobb kelési arányt a 10 %-os metanol és az 1:200-as hígítás adta, továbbá a lassú hűtési sebességű szakasz (-2, -5 vagy -10 °C/perc) különböző hőmérsékleti végpontokat (-25 és -70°C között) eredményezett, mielőtt a folyékony nitrogénbe helyezéssel (LN₂) megkezdődött a gyors hűtési szakasz. A kelési százalék abban az esetben, amikor a spermiumokat -5 °C/perc sebességgel hűtötték -45-ről -50 °C-ra, majd 10 °C/perc sebességgel -55 °C-ra megegyezett a kontroll értékekkel. Megvizsgálták, mi történik abban az esetben, ha a spermiumokat -5 °C/perc hűtési sebesség mellett 0, 2 és 5 percig -30, -35 és -40 °C-on tartják (három lépcsős hűtés), mielőtt folyékony nitrogénbe helyezéssel elindul a gyors hűtési szakasz. A kelési eredmények alapján azok -35 °C-on 5 percig, ill. -40 °C-on 2 és 5 percig tartott spermiumok esetében egyeztek meg a kontroll eredményekkel.

Horváth és Urbányi (2000) **6 védőanyag hatását vizsgálták** afrikai harcsa spermájának mélyhűtése során. Glicerint (5-11 %), etilén-glikolt, metanolt, propilén-glikolt (5-15 %) és DMSO-t, illetve DMA-t (10 %) teszteltek különböző egyensúlyi idővel (2-30 perc). A kutatók NaHCO₃-CO₂-ral pufferelt 6 %-os fruktóz oldatot használtak hígítóként a kísérletben. A hűtőmediumot 250 µl-es műszalmákba töltötték és programozható hűtőberendezés (Cryocell-15, BLS) segítségével 4 °C/perc sebességgel 3 °C-ról -4 °C-ra, majd 11 °C/perc sebességgel -4°C-ról -80°C-ra hűtötték. Ezt követően folyékony nitrogénbe helyezték a mintákat. A felolvasztást során 5 másodpercig 40°C-os vízfürdőbe merítették a szalmákat. A termékenyítési és kelési próbákat csak DMSO-val és DMA-val hűtött spermával végezték el nedves (Magyary et al. 1996c, leírása alapján: ezzel az eljárással csökkenthető a védőanyagok ikrára kifejtett toxikus hatása) és száraz (hagyományos keltetőházi technológia) termékenyítési eljárással. Az etilén-glikol, a glicerín, a metanol és a propilén glikol gyenge eredményeket adott. Átlagos felolvasztás utáni motilitást (44±9,7 és 22,6±18,1%) érték el 10 perces egyensúlyi idő mellett DMSO, ill. DMA védőanyag segítségével. A legmagasabb termékenyülési (86,8±3,1 %) százalékot DMA, a legmagasabb kelési (67,1±11,9 %) százalékot pedig DMSO segítségével érték el 200 µl hígított sperma és nedves termékenyítési eljárás esetében. Megállapításuk szerint a védőanyagok használata növelte a torz lárvák arányát a kontrollhoz képest, továbbá a DMA-nak némileg gyengébb a mélyhűtés során a védő hatása, azonban szobahőmérsékleten kevésbé káros a DMSO-hoz képest.

Szintén ebben az évben a kutató csoport az előző, illetve korábbi években elvégzett kísérletek alapján összefoglaló közleményükben **meghatározták az afrikai harcsa spermamélyhűtésének módszerét** (Urbanyi et al., 2000). A leírás szerint a hígító 6% fruktózt (6 g fruktóz 100 ml desztillált vízben feloldva) és 10 % végső koncentrációban DMSO-t vagy DMA-t tartalmaz. A hígító 7,73-as pH-ját NaHCO₃ pufferrel állították be. Megjegyzésük szerint fontos a hígítót és a védőanyagot összekeverni, mielőtt a puffert hozzákeverik, a megfelelő pH érték biztosításának érdekében. A sperma:hígító aránya 1:1 volt. Az egyensúlyi időt 10 percben határozták meg 3 °C-os hőmérsékleten. Ezt követően a sperma és hígító elegyét 0,25 ml-es műszalmákba töltötték, elkerülve a légbuborékok képződését a műszalmák belsejében. Csak 200 µl spermát töltöttek a műszalmákba, azért, hogy a felolvasztás során vízzel ne érintkezzen a sperma. A szalmákat programozható hűtőberendezés segítségével hűtötték a már korábban is közölt módon: 4°C/perc sebességgel 3 °C-ról -4 °C-ra, majd 11 °C/perc sebességgel -4°C-ról -80 °C-ra. Ezt követően a szalmákat folyékony nitrogénbe helyezték. A felolvasztást során 5 másodpercig 40 °C-os vízfürdőbe merítették a szalmákat.

A fentiekben leírt mélyhűtési módszert vette alapul Miskolczi et al. (2005) is, annyi különbséggel, hogy a **mintákat 0,25, 0,5 és 1,2 ml-es műszalmákban hűtötte**. Munkájuk során találtak deformált lárvákat. Meglepetésre a mélyhűtött, majd felolvasztott spermából származó deformált lárvák egy része haploid volt, de csak 0,25 és 0,5 ml-es műszalmából származó spermiumok esetében. Az egyik lehetséges magyarázat szerint a spermiumok genomja a mélyhűtés során károsodott, ennek ellenére a hímivarsejtek még képesek a mozgásra illetve a termékenyítésre, azonban örökítőanyaguk nem vesz részt az embriók fejlődésében. Ezt a hipotézist támasztja alá a tény, hogy nem találtak haploid egyedeket a friss spermából származó deformált, kontroll egyedek között.

A szintén afrikai eredetű ***Heterobranchus longifilis*** spermáját Otémé et al. (1996) hűtötte, aki 5% DMSO-t, 5% glicerint és 10% tojássárgáját használt védőanyagként és 81,1 %-os (1 órán keresztül a folyékony nitrogénben tárolt minta esetében), ill. 83%-os (8 hónapig a folyékony nitrogénben tárolt minta esetében) kelést ért el az így hűtött spermával (kontroll: 78,9%).

Az Ázsiában honos ***Heteropneustes fossilis*** és ***Clarias batrachus*** spermáját hűtötte Padhi és Mandal (1995), akik három hűtőmedium kombinációt (hígító és védőanyag) próbáltak ki munkájuk során. A **védőanyag minden esetben glicerint** volt. 1,5 ml-es centrifugacsövekbe töltötték a mintát, mely 500 µl spermából állt, és a glicerint végső koncentrációja 10 % volt. A szobahőmérsékletre egyenesen -70 °C-os ultramélyhűtőbe tették a mintákat, ahol is vagy tovább tárolták vagy folyékony nitrogénbe helyezték őket. A mintákat 25 °C-on olvasztották fel 120 másodpercig, majd a szuszpenziót 5000 percenkénti fordulatszámon sebességgel 2 perccel keresztül centrifugálták. A felülúszó részt eltávolították, a kiülepedett spermiumokat pedig 1 ml 0,6%-os sóoldatban szuszpendálták a termékenyítést megelőzően, majd 100-120 ikraszemet termékenyítettek kontroll és kezelt spermával. Utóbbi esetben 87 %-os termékenyülést értek el.

A ***Pangasius gigas*** spermájára dolgoztak ki Mongkonpunya et al. (2000) mélyhűtési eljárását. Kísérletükben fejt, ill. heréből préseléssel kinyert spermával dolgoztak. A fejt sperma esetében a tejet fejest követően azonnal hígították NaCl-al vagy módosított HBSS oldattal. A heréből kinyert spermát **streptomycinnel és penicillinnel kezelték** a baktériumos és gombás fertőzések elkerülése végett. Védőanyagként DMSO-t használtak, így hígítás fejt sperma esetén 1:3 (sperma:hígító, v:v), míg a heréből kinyert sperma esetében 1:10 (g:ml) arányban alakult. A sejtsűrűség $4,2 \times 10^9$ volt milliliterenként. A mintákat ezután 2 és 5 ml-es krio-csövekbe töltötték, majd 15 perces egyensúlyozási idő elteltével nitrogéngőzbe helyezték őket és lehűtötték -80 °C-ra. Ezt követően a mintákat folyékony nitrogénbe kerültek a végső felhasználásig.

Másik két ázsiai ***Pangasius*** faj a ***P. hypophthalmus*** (régibbi nevén *P. sutchi*) és a ***P. larnaudii*** spermáját Kwantong és Bart hűtötte hasonló módszerrel. A ***Pangasius hypophthalmus*** esetében **4 védőanyagot** (a metanol, DMSO-t, DMA-t és az etilén-glikolt) és 3 hígítót (Ca-mentes HBSS-t, HBSS-t és HBSS, ill. NaCl keveréket), használtak munkájuk során (Kwantong és Bart, 2003). A hígított spermát 250 µl-es műszalmákban, programozható hűtő berendezés segítségével fagyasztották, majd 2 hétig folyékony nitrogénben tárolták a mintákat. A szobahőmérsékleten történő felolvasztás után, motilitás vizsgálatot, ill. termékenyítési próbát végeztek. A legjobb termékenyülési százalékot a 12% DMSO-val és NaCl-al, egy lépcsőben -10°C sebességgel hűtött minta adta (81%-a a kontrollnak). A 12%-os DMA is magas értéket eredményezett (51%-a a kontrollnak) a metanolhoz (38%-a a kontrollnak), ill. az etilén-glikolhoz (12%-a a kontrollnak) képest.

Ezekre az eredményekre alapozva a kutatók a másik faj (*P. larnaudii*) esetében 3 hűtőmediumot teszteltek: 1. DMSO (10%) és NaCl (0,9%); 2. DMA (10%) és Ca-mentes HBSS, 3. metanol (5%) és NaCl (0,9%) (Kwantong és Bart 2006). A mélyhűtés folyamata megegyezik az előző kísérletben leírtakkal. A legjobb termékenyülési eredményt (a kontrollnak a 70%-a) az 1. hígítóval kapták. A 2. hígító eredményei (a kontrollnak a 42%-a) magasabbak voltak a 3. hígító eredményeinél (a kontrollnak a 12%-a). A két kísérlet alapján megállapították, hogy a sperma életképesség teszt nem megbízható eljárás a termékenyítő képesség megbecsülésére. Koldras és Bieniarz (1987)-hoz hasonlóan a termékenyítési próbát javasolják a felolvasztott spermiumok minőségének értékelésére. Emellett megállapították, hogy amennyiben egy működő módszert kifejlesztettek egy halfajra, akkor a módszer alkalmas lehet más hasonló fajok esetében is.

Az Amerikai Egyesült Államokban tenyésztett **csatornaharcsa** (*Ictalurus punctatus*) spermamélyhűtésével először Guest et al. (1976) foglalkozott, akik 10% DMSO használatával és 2 órás egyensúlyozási idővel érték el a legjobb eredményt, ám csak a felolvasztás utáni motilitást vizsgálták.

Tiersch et al. (1994) egy átfogó munkát közöltek a csatornaharcsa spermájának mélyhűtéséről. Megállapították, hogy a **legkedvezőbb motilitást** 5 és 10% metanol védőanyag alkalmazása mellett kapták, és az így hűtött mintákkal 24-97% termékenyülést értek le, ami nem különbözött az ugyanazon hímekkel elért kontroll termékenyüléstől.

Christensen és Tiersch (1997) az előző kísérletben kapott eredményeket finomítani próbálta. Ennek érdekében összehasonlították, hogy az **5, 10, 15 %-os metanol vagy DMA** megfelelőbb-e védőanyag gyanánt. Leírásuk szerint az 5 %-os metanol szignifikánsan magasabb motilitás értékeket eredményezett, mint az 5, 10, 15 %-os DMA. Bármelyik védőanyag 5%-os koncentrációban szignifikánsan magasabb értékeket eredményezett a 10, ill. 15 %-os koncentrációknál. Összehasonlították a 0,5 és 0,25 ml-es műszalmák használatának hatékonyságát, mely szerint a 0,25 ml-es műszalma szignifikánsan magasabb motilitás értékeket eredményezett. Minden esetben szignifikáns kölcsönhatást találtak a védőanyag és a védőanyag koncentrációja, a védőanyag és a műszalma méret, a koncentráció és a műszalma méret, a koncentráció a védőanyag és a műszalma méret között.

Ugyanez a kutatópáros a csatornaharcsa sperma mélyhűtésének folyamatát egyre részletesebben vizsgálta (Christensen és Tiersch, 2005). Munkájuk során az 5 %-os metanol toxicitását, a hűtési sebességet, illetve a felolvasztási időt és hőmérsékletet kutatták. Nem csökkent a minta motilitása, amikor 5%-os metanolban 1, ill. 48 órán és 1 óra, ill. 5 napon keresztül állni hagyták a spermát. A 45 °C/perc-es hűtési sebesség szignifikánsan kisebb motilitás csökkenést okozott a 3 °C/perc-es sebességnél (33±9%, ill. 83±13%). A felolvasztási kísérletek során azt tapasztalták, hogy az 50 °C-os víz szignifikánsan kisebb motilitás csökkenést okozott a 30 °C, ill. 40 °C-os víznél (25±14% ill. 51±21% és 59±11%). A felolvasztási idő tekintetében a 10 másodperc eredményezett kisebb motilitás csökkenést az 5 másodperccel ellentétben (38±12% és 52±12%). A felolvasztási hőmérséklet és idő között nem találtak összefüggést. Az 5 %-os metanol kisebb motilitás csökkenést okozott szemben a 10 %-os metanollal (43±17% és 67±14%). A regresszió analízis szerint 5 % és 10 %-os metanol esetében nincs kapcsolat ($r^2=0,012$ és $r^2=0,011$) a mélyhűtést megelőző és felolvasztást követő motilitás értékek között.

Az észak-amerikai **kék harcsa** (*Ictalurus furcatus*) spermáját 3 koncentrációban ($3,75 \times 10^8$ spermium/szalma, $1,5 \times 10^9$ spermium/szalma és 6×10^9 spermium/szalma) 0,25 ml és 1 ml-es műszalmákban, **főzőtejből készült tejporral** kiegészített

metanol, illetve DMSO védőanyagok segítségével 12 hónapig hűtötte Bart et al. (1998). HBSS oldatban 5% metanolt és 15% tejport (pH=7,4), míg szintén HBSS oldatban 10% DMSO-t (pH=7,2) oldottak fel. A termékenyítési kísérlet során 450 csatornaharcsa ikraszemet termékenyítettek. A két faj keresztezésére azért van szükség, mert a hibridek gyorsabban és egyenletesebben nőnek, stressztűrésük nagyobb, hatékonyabban értékesítik a takarmányt és a betegségekkel szemben ellenállóbbak (Dunham és Smitherman, 1987). Az **alkalmazott egyensúlyi idő** kevesebb, mint 3 perc volt. A mintákat folyékony nitrogén gőzében hűtötték 6,5 cm-rel a nitrogén felszíne felett. A műszalmákban 6 perc után -66 °C-ot mértek. A felolvasztás szobahőmérsékleten történt (25 °C) 390 °C/perc sebességgel. A kontrollhoz viszonyított termékenyítési arány DMSO esetében 32 % (23-54%) volt. A metanol-tejpor keverék alkalmazásakor a kutatók nem kaptak megfelelő termékenyítési eredményeket. A legmagasabb relatív termékenyítési eredményt (54%) a legmagasabb spermakonzentrációval rendelkező minta esetében kapták. A másik két koncentrációjú sperma által kapott termékenyítési arányok esetében nem találtak szignifikáns különbséget. A műszalmák mérete sem befolyásolta szignifikánsan a termékenyítési arányt. Több esetben észlelték, hogy felolvasztást követően a sperma gyakorlatilag termékenyítés nélkül, zselészerűen koagulált egy csomóban, és nem keveredett el az ikrával. Ezt a jelenséget cápaharcsa (*Pangasius sutchi*) esetében már korábban is megfigyelték (Withler, 1982).

Ezt követően Lang et al. (2003) kísérletet tettek üzemi körülmények között a kék harcsa spermamélyhűtésre, ill. a mélyhűtött sperma segítségével hibridek létrehozására. Négy különböző védőanyag különböző koncentrációjának friss spermára kifejtett akut toxicitását vizsgálták meg: DMSO (5%, 10%, 15%, 20 %), metanol (5%, 10%, 15%, 20%, 25%), glicerín (5%, 10%) és DMA (5%, 10%, 15%). Eredményként a kutatók azt kapták, hogy a metanolt (5%, 10%, 15%) tartalmazó minták motilitása szignifikánsan magasabb volt a többi védőanyagénál. Részletesebb analízis szerint az 5%, illetve 10 %-os metanol esetében nem kaptak szignifikáns eltérést a motilitás értékek között. A spermát 1:1 arányban hígították HBSS és védőanyag keverékével, majd a motilitást a hígítást követő 0, 15 és 30 percben értékelték. A mélyhűtést a bika spermán alkalmazott eljárás segítségével végezték, mely során védőanyagként metanolt (10%) használtak. A hígított spermát 0,5 ml-es műszalmákba és 110 ml-es sertés ondózsákokba (5, ill. 10 ml-es adag/110 ml-es ondózsák) helyezték. A mintákat **üzemi hűtő berendezésbe** rakták és 16 °C/perc sebességgel -140 °C-ig hűtötték, majd folyékony nitrogénbe helyezték őket tárolás céljából. Felhasználás előtt a szalmákat 7 másodpercig (40 °C), míg a 10 ml-es adagot tartalmazó ondózsákokat 12 másodpercig olvasztották fel (40 °C). A termékenyülési arány 83±13% (2000. év) és 54±27% (2001. év) volt műszalma esetében. A kezdeti motilitás és a termékenyülés között nem volt szignifikáns összefüggés. A termékenyülés 57±24% volt 5ml-es adagot tartalmazó ondózsák esetében, míg 10 ml-t tartalmazó ondózsák esetében 55±10%-a termékenyült az ikrának. A vizsgálatok alapján a szerzők alkalmasnak találták a módszert gyakorlati felhasználásra hibrid harcsa előállítására.

A Dél-Amerikában őshonos **pintado** (*Pseudoplatystoma corruscans*) spermáját 10 % metanol és 15 % tejpor segítségével mélyhűtötték és a kontrollal megegyező termékenyülést értek el (Carolsfeld et al., 2003).

Egy trópusi halfaj, a **Mystus nemurus** spermáját kutatók 1:20 arányban oldották Ringer oldatban, védőanyagként DMSO-t, etanolt, metanolt és glicerint használtak 5, 10 és 15%-os végső koncentrációban (Muchlisin et al., 2004). Az **elegyet 5 ml-es ampullákba töltötték**, majd jégtörmelék közé helyezték 5 percig egyensúlyi

céljából. Mielőtt folyékony nitrogénbe kerültek volna a minták, áthelyezték őket 5 percre szárazjeget tartalmazó jégdobozba. Az ampullákat 15 nap múlva olvasztották fel 40°C-os vízfürdőben 5 perc alatt. A védőanyagok között, a védőanyagok koncentrációja között, illetve a védőanyag és a koncentráció között szignifikáns összefüggéseket találtak. A legjobb motilitás eredményt, 58 %-ot a 10 %-os metanol adta (kontroll 92 %), ezt követte a 10 és a 15 %-os etanol, majd az 5 %-os DMSO (49, 49 és 48 %).

Pan et al. (2008) kutatásait a *Pelteobagrus fulvidraco* fajon végezte. A spermamélyhűtés során különböző hígítók (Ringer, D-15, Kurokura-1) és védőanyagok (DMSO, glicerin, metanol) kombinációját vizsgálta. A legjobb motilitási (65±5%), termékenyülési (90,47±3,67%, kontroll: (97.55±2.74%) és kelési (88±4%, kontroll: 92±5%) eredményeket 10%-os metanol és Ringer kombinációja esetében kapták.

A **harcsaalakúak fajgazdagsága miatt az alkalmazott módszerek is rendkívül sokfélék.** Az ide tartozó fajok spermamélyhűtése igen sok kézzelfogható gyakorlati lehetőséggel kecsegtet, mivel a fajokra általában jellemző, hogy igen kevés hím ivarterméket termelnek (Legendre et al., 1996), amit többnyire lehetetlen lefejteni. A gyakorlatban ezért a hím egyedeket feláldozzák és a spermájukat közvetlenül a kioperált heréből préselik ki. A mélyhűtés értékes hím tenyészállatok ivartermékének tárolására ad lehetőséget az állatok feláldozása után is. Emellett fontos a gyakorlatban a mélyhűtési módszer viszonylagos egyszerűsége is, mivel a harcsafajok termelése jórészt trópusi országokban fontos gazdasági ágazat, ahol a drágább technológiák beszerzésére és üzemeltetésére sokszor nincs lehetőség.

2.6.4. Sügéralakúak

A sügéralakúak (*Perciformes*) rendjéből számos édesvízi és tengeri halfaj hímivarsejt mélyhűtését írták le kutatók az évek során. Ilyen faj például az **aranydurbincs** (*Sparus aurata*) (Chambeyron és Zohar 1990, Fabbrocini et al., 2000, Cabrita et al., 2005) vagy a **nílusi tilápia** (*Oreochromis niloticus*) (Rana és McAndrew 1989, Godinho et al., 2003). Ellentétben a fent felsorolt halfajokkal, a **sügérfélék** (*Percidae*) – ahova az általam vizsgált süllő (*Sander lucioperca*) is tartozik - **esetében a sperma mélyhűthetőségének kevesebb figyelmet szenteltek.**

A sügérfélék családjából ismereteink szerint legkorábban Moore (1987) foglalkozott az egyik **amerikai süllőfaj, a walleye** (*Sander vitreus*) spermamélyhűtésével. Vizsgálatai során a walleye szemínális folyadékának összetétele alapján készített hígítót kombinálta DMSO, szarvasmarha szérum albumin (BSA) és PRO-FAM[®] szója fehérje védőanyaggal 4 különböző kombinációban. Az egyes kombinációk a következőképpen alakultak: 1. 5 % DMSO; 2. 7% DMSO - BSA (4 mg/ml) - PRO-FAM (7,5 mg/ml) keveréke; 3. 5% DMSO - BSA (4 mg/ml) – PRO-FAM (7,5 mg/ml) keveréke; 4. 7% DMSO - BSA (4 mg/ml). Mindegyik hígító tartalmazott további 15 g glükózt és 5 g mannitolt 2 literenként. A spermát 1:2 arányban hígította a hígító kombinációkkal, majd a mintákat 0,25 ml-es műszalmába töltve 30 percig hűtötte szárazjégen. A műszalmákat folyékony nitrogénben tárolta. A felolvasztás során a hígító fürdő hőmérséklete 21,1 vagy 32,1°C volt. A szerző 1985-ben 59 ml ikrát, míg 1986-ban 118 ml ikrát termékenyített 2 ml mélyhűtött, majd felolvasztott spermával. A kísérlet eredménye szerint, a mélyhűtött walleye sperma szignifikánsan kevesebb ikrát termékenyített minden ismétlésben a friss spermához képest. A mélyhűtött sperma termékenyülési

százaléka 55,2 és 83,2% (1985), ill. 39,2 és 68,0% (1986) között volt. A natív sperma 1985-ben 94,4%-os termékenyülést eredményezett, míg 1986-ban 83,2 és 96,6% között ingadozott. A legjobb termékenyülési eredmények 1985-ben a 2 és 3-as hígító kombinációval születtek, melyek szignifikánsan eltértek az 1. és 4. hígítók eredményeitől. Az 1986-os évi kísérletek során a 2. sperma-hígító kombináció eredményezett szignifikánsan magasabb értéket a másik három sperma-hígító kombinációnál.

Egy újabb kísérlet során (Bergeron et al., 2002) **3 különböző, DMSO-ra alapozott hígítót** (1. 7% DMSO, 4 mg/ml BSA, 7,5 mg/ml PRO-FAM és Rathbun hígító keveréke; 2. H₂O, 3,6 mg/ml NaCl, 10 mg/ml KCl, 0,09 mg MgCl₂, 0,2 mg/ml NaHCO₃ és 10% DMSO keveréke; 3. H₂O, 0,3 M glükóz, 10% DMSO keveréke) és 3 hígítási arányt (1:5, 1:9, 1:15) vizsgáltak a kutatók szintén **walleye** fajon. A legjobb eredményt az 1:15-ös arányban az 1. hígítóval kevert sperma esetében kapták. Ez az eljárás 46±3%-os felolvasztás utáni motilitást eredményezett, szemben a 2. és 3. hígító 10 és 5%-os értékeivel. A friss sperma motilitása 75 és 80% között mozgott. Az 1. hígítóval, 1:15 arányban kevert sperma mélyhűtést és felolvasztást követően 28,51±6,84 és 59,02±1,06 % közötti termékenyítést eredményezett (12 napos szempontos ikrán vizsgálva), míg natív spermánál ez az érték 83,23±3,16 és 91,01±0,63 % között alakult.

A másik halfaj, a szintén az amerikai kontinensen honos **sárga sügér** (*Perca flavescens*) spermájának hosszú távú tárolásával először Cierieszko et al. (1993) próbálkozott. A kísérlet során a kutatók **két hígítót használtak**: a DMSO hígító 125 mM szacharózt, 6,5 mM redukált glutationt, 100mM kálium-bikarbonátot (KHCO₃), 8 % DMSO-t és 10% tojássárgáját tartalmazott, míg a glicerín-glükóz hígító összetétele a következőképpen alakult: 0,3 M glükóz, 20 % glicerín. Mindkét hígító esetében 4×, illetve 8× hígítást alkalmaztak. A spermát 0,5 ml-es adagokban szárazjégen hűtötték -79 °C-on (az ún. pellet-módszerrel), amelyeket utána az erre szolgáló ampullákban tároltak cseppfolyós nitrogénben 1,5-2 hónapig. A termékenyítést megelőzően 3 vagy 4 mélyhűtött adagot szobahőmérsékletű fiziológiás sóoldatban olvasztottak fel, majd ezt követően a spermaszuspenziót összekeverték egy adag ikrával (1175 ± 267 ikraszemmel). A termékenyülést 8-10 °C-os vízben 7 nap múlva számolták. Annak ellenére, hogy a 8× hígított DMSO hígítóval magasabb termékenyülési %-ot lehetett megfigyelni, mint a 4× hígításnál (28,7±27,2, ill. 18,3±13,5), a két érték között statisztikailag kimutatható különbség nem volt. A glükóz-glicerín hígítóval kevert sperma gyakorlatilag minden termékenyítő képességét elvesztette (0,3 %), így a DMSO hígító termékenyülési eredménye (23,2 %) szignifikánsan jobb értéket eredményezett a másik hígítónál, azonban mindkét hígító eredménye szignifikánsan elmaradt a friss sperma használatával kapott termékenyülési százaléktól (53,4 %).

Később Glogowski et al. (1999a) számolt be ismét sikeres **sárga sügér** spermamélyhűtésről. A kutatás során **4 védőanyagot** tesztelt: 1. DMSO (15 % DMSO); 2. DMSO-tojássárgája keverék (15 % DMSO és 10 % tojássárgája); 3. DMA (15 % DMA); 4. DMA-tojássárgája keverék (15 % DMA és 10 % tojássárgája). Mindegyik hígítóhoz 0,45 M szacharózt keverték. A mélyhűtést az előző kísérletben leírtak szerint végezték, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben 0,05 ml-es adagokban hűtötték a spermát. A felolvasztás 0,5 % NaCl oldatban történt 21 °C-on. Megközelítőleg 3×10⁶ spermium jutott egy ikraszemre. A friss sperma 61,1±3,1 % termékenyülést eredményezett szempontos embrió stádiumban. Mélyhűtött sperma esetében 42,5-47,2 % közötti értéket kaptak (ami a friss sperma 69,6-77,3 %-a), és az egyes hígítók között nem volt szignifikáns különbség. Ez az eredmény már jelentős fejlődést mutat (~30 %), az előzőekben leírtakhoz képest.

Az **elsők között** saját kutatócsoportunk végzett mélyhűtési kísérleteket sügérén (*Perca fluviatilis*). Horváth és Urbányi (2001) leírása szerint a spermát 1:9 arányban hígították, 0,25 ml-es műszalmákat használtak. 5 különböző hígítót (300mM szacharóz és 30 mM Tris (pH 8.0); 350mM glükóz és 30 mM Tris (pH 8.0); 200 mM KCl és 30 mM Tris (pH 8.0); Magyary-féle módosított Kurokura-hígító: 360 mg NaCl, 1000 mg KCl, 22 mg CaCl_2 , 8 mg MgCl_2 és 20 mg NaHCO_3 100 ml vízben feloldva, Magyary et al., 1996c), ill. 2 védőanyagot (DMSO, illetve metanol 10 % végső koncentrációban) teszteltek a vizsgálatok során. A mélyhűtés folyamata során az előző kísérletben is leírt polisztirol dobozos technikát alkalmazták (hűtés 3 cm-rel a folyékony nitrogén felszín felett, 3-5 percig). A mélyhűtött szalmákat folyékony nitrogénnel töltött kaniszterekben tárolták 2-3 hétig. A termékenyítés során 350-400 db ikrát termékenyítettek 1 műszalma tartalmával. A felolvasztás 40 °C-os vízfürdőben 5 másodpercig tartott. A megfigyelések szerint a felolvasztást követő motilitás eredményekben nem volt szignifikáns különbség az egyes hígítók és védőanyagok között. Azonban a cukor alapú hígítók előnyösebb hatását észlelték a sperma túlélését tekintve, szemben az ionos összetételű hígítókkal. A legmagasabb motilitást a glükóz-DMSO párosítás eredményezte ($33 \pm 22\%$). A termékenyülési eredményeket tekintve mélyhűtött sperma esetében a legmagasabb érték 63 %, míg a friss sperma esetében 61 % volt.

Az egyik tanulmányban a **normál és ivarátfordított sügér** hímek mélyhűtött, majd felolvasztott spermájának motilitását és termékenyítőképességét hasonlította össze egy nemzetközi kutatókból álló csoport (Linhart et al., 2008). Az ivarátfordított egyedek heréjét eltávolították a hasüregből, majd a szeletekre vágott heréből a spermát nylon hálón keresztül préselték ki. A normál halak spermáját fejéssel gyűjtötték. Mindkét mintát 300 mM-os glükóz oldattal hígították 1:6 arányban. Védőanyagként DMSO-t használtak 10 % végső koncentrációban. Az így kapott elegyet 0,5 ml-es szalmákba töltötték, majd polisztirol dobozban hűtötték cseppfolyós nitrogén gőzében 3 cm-rel a folyékony nitrogén felülete felett 10 percig. A felolvasztás 40 °C-os vízfürdőben 8 másodpercig tartott. 1 g ikrát (451 db) 12×10^5 illetve $2,4 \times 10^5$ spermával termékenyítettek. A normál egyedek mélyhűtött spermája hasonló kelési arányt eredményezett, mindkét sperma-ikra arány esetében (12×10^5 : 37,2 % és $2,4 \times 10^5$: 29,1 %). Az átfordított ivarú hímek spermájának esetében nem találtak különbséget a két érték között (12×10^5 : 7,3 % és $2,4 \times 10^5$: 6,6 %). A kapott eredményekből az is kiderült, hogy a fejt sperma alkalmas a mélyhűtésre, azonban a heréből préselt sperma gyengébb minőségű, mint a normális hímek fejt spermája.

A Szent István Egyetem kutatócsoportja tett kísérletet 3 sügérféle, a **magyar bucó** (*Zingel zingel*), a **széles durbincs** (*Gymnocephalus baloni*) és a **kőszüllő** (*Sander volgensis*) spermájának mélyhűtésére (Keresztessy et al., 2003). Sikeres fagyasztást azonban, csak a magyar bucó esetében sikerült kivitelezni. A sperma hűtéséhez 3 féle hígítót használtak: 1. 350mM fruktóz, 30 mM Tris, pH 8,0; 2. 200 mM KCl, 30 mM Tris; 3. Magyary-féle módosított Kurokura-hígító 100 ml-re 350 mg NaCl, 1000 mg KCl, 22 mg CaCl_2 , 8 mg MgCl_2 , 20 mg NaHCO_3 . A hígítókhoz kétféle védőanyagot, DMSO-t és metanolt adagoltak 10 %-os végső koncentrációban. A spermát 1:9 arányban hígították a hűtőmediummal, majd mindezt 0,25 ml-es műszalmákba szívták fel és szintén polisztirol dobozban hűtötték (4 cm-re a nitrogén felszínétől 3 percig). A szalmákat 40 °C-os vízfürdőben 5 másodpercig olvasztották fel. A legmagasabb átlagos felolvasztás utáni eredményeket KCl hígítóval és 10 % metanol védőanyag használatával kapták. A metanol használatával hűtött minták motilitása általában magasabb volt, mint DMSO esetében.

3. Eredmények tárgyalása

3.1. A kísérleti munkák általános áttekintése és a folyamatok standardizációja

3.1.1. Általános információk

A dolgozatban bemutatott eredmények a 2001-2010. év közötti időszakból származó kutatási munkáim, és nemzetközi együttműködések során kapott vizsgálati adatokból kerültek kiválasztásra. Jeleznem szükséges, hogy a rendelkezésemre álló adatok kisebbik hányada kerül itt bemutatásra, mivel a dolgozat terjedelmi korlátja határt szab az adatsorok és vizsgálatok bemutatására.

Viszont fontos adatnak tartom, hogy ezen 10 éves időszak alatt az egyes halfajok mekkora egyed nagyságával dolgoztam, amelyekből a bemutatásra kerülő adatok származnak (2. sz. táblázat).

2. sz. táblázat: A SzIE, MKK-KTI Halgazdálkodási Tanszék által a hal hímivarsejt mélyhűtési vizsgálatokba bevont egyedek száma halfajonként (db)

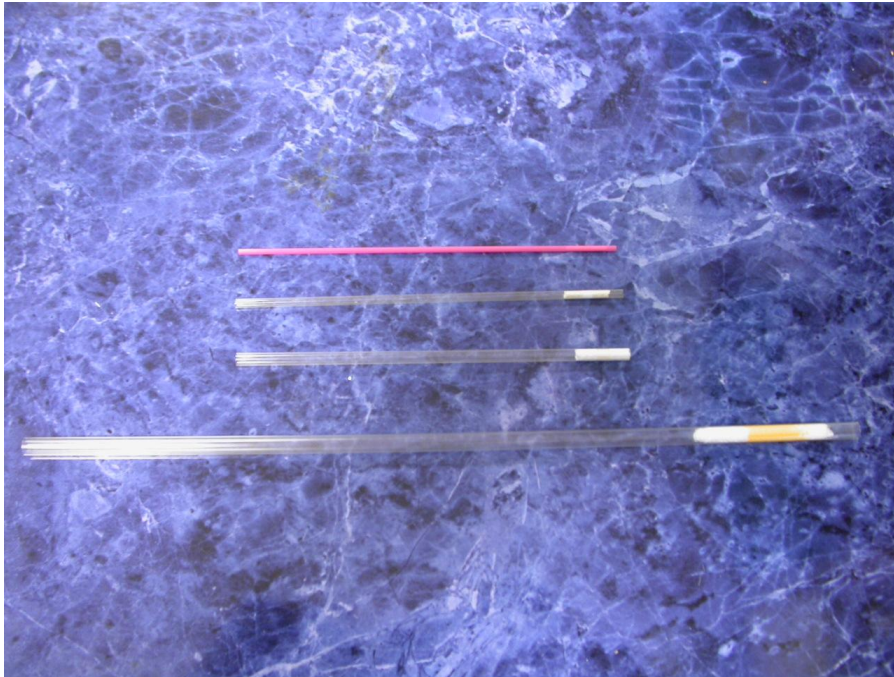
	Ikrás	Tejes	Összesen
Ponty	178	980	1158
Bodorka	29	62	91
Karikakeszeg	17	29	46
Dévérkeszeg	37	61	98
Márna	22	35	57
Harcsa	40	69	109
Süllő	21	35	56
Kecsege	44	65	109
Összesen	388	1336	1724

3.1.2. Standardizálási vizsgálatok

A dolgozatom egyik célkitűzése, hogy a különböző mélyhűtési módszerek egységesítést, ennek relevanciáját bemutassa. Az alap kritérium ehhez a munkához a nagymennyiségű elemszám, melyet a 2. sz. táblázatban bemutatott egyedszámok alátámasztanak.

Emellett lehetőség szerint törekedtem egyszerű, a terepen is alkalmazható metodikákat használni, a szofisztikált kutatási módszereket igyekeztem mellőzni. Így pl. viszonylag könnyen összeállítható hígítókat preferáltam, a hűtés-felolvasztás-termékenyítés menetét próbáltam a keltetőházi technológia feszített idő- és cselekvési üteméhez igazítani. Megkíséreltem lehetőség szerint a különböző változókat minimalizálni: pl. a műszalmák esetében törekedtem a nagyobb méret alkalmazására (13. sz. ábra), viszont ezen törekvések elfogadottságát az határozta

meg, hogy mennyiben alkalmazható a módszer a termékenyítés és a kelés eredményeinek romlása nélkül.



13. sz. ábra: Különböző térfogatú műszalmák: felülről lefelé 0,25 ml, 0,5 ml, 1,2 ml és 5 ml (fotó: Horváth Á., 2004)

3.2. Kísérleti munka és eredmények bemutatása ponty fajokon

3.2.1. Bevezetés, a munka indokoltsága

A **ponty hazánk legfontosabb gazdasági halfaja**, mely mind termelési volumenében, mind termelési értékben vezető szerepet játszik. A ponty sperma mélyhűtése, illetve ezen technológia fejlesztése számtalan kutató munkájának középpontjában állt, és áll még napjainkban is. A közölt irodalmak heterogenitása azonban azt mutatja, hogy napjainkig nem sikerült olyan egyszerű, könnyen reprodukálható, a gyakorlatba bevezethető módszert találni, mely metodikát teljesen, vagy részleteiben alkalmaznák és elfogadnák. Így a módszertan fejlesztésénél szükségesnek láttam a génbanki felhasználás mellett olyan módszertant, illetve annak alapjait kidolgozni, melyre alapozva széleskörű és elfogadott technológia fejleszthető ki. A fajokon végzett nagyszámú kísérlet jó alapot biztosított ahhoz, hogy a standardizálási célkitűzésekhez anyagot és információt gyűjtsék, és az egységesítési rendszer alapjait kidolgozzam.

3.2.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása

A kapott eredmények 2001-2006. év közötti hazai és nemzetközi együttműködésekben származó vizsgálataimra alapultak. A **kísérletek gyakorlati helyszíne** a Haltermelők Országos Szövetségének és Terméktanácsának (ma: Magyar Haltermelők és Halászati Vízterület-hasznosítók Szövetsége) **dinnyési ivadéknevelő Tógazdasága** volt. Vizsgálataimhoz a gazdaságban tenyésztett ponty tájfajtát, a dinnyési tükrös pontyot használtam (14. sz. ábra), a kísérleti munkát a gazdaság keltetőházában végeztem. Az egyedeket minden évben a telelők lehalászását követően morfológiai bélyegek (szaporításra való felkészültség, sérülésmentes testfelület) alapján kiválasztottam és a keltetőházba szállítottam.



14. sz. ábra: A dinnyési tükrös ponty tájfajta (fotó: Szabó K., 2002)

3.2.3. Az egyedek oltása

Az ivartermék kinyerése érdekében hormonális indukciót alkalmaztam. Így biztosítottam az ovulált folyós ikrát és a megfelelő minőségű nagy mennyiségű spermát. Az ovuláció és a spermiáció indukciójához Ovopel hormonkészítményt használtam (1 adag/ttm kg) mind a tejeseknél, mind az ikrásoknál. A

hormonkészítményt halfiziológiás sóoldatban (0.65%-os NaCl) szuszpendáltattam el. A mi esetünkben alkalmazott készítmény mGnRH analógot és METOCLORAMID vízdoldékony dopamin receptor antagonistát tartalmazott.

Az így nyert szuszpenziót steril orvosi fecskendő segítségével a halak hasüregébe injektáltam, a hasúszó eredési pontjánál (15. sz. ábra). A hímeknek a fejes előtt 24 órával adtuk be a hormonkészítményt, míg a nőstényeknél ez két adagban történt: 24 órával a fejes előtt kapták az előadagot (a teljes adag 10%-a), míg a döntő adagot (90%-ot) a fejes előtt 12 órával (23 °C víz hőmérsékletnél).



15. sz. ábra: Ponty anya oltása (fotó: Szabó T., 2005)

3.2.4. A tejesek fejése

A halakat kivettük a tároló kádakból, majd altatóoldatot (Chinaldint) tartalmazó kádba helyeztük őket. Amikor a halak megfelelően elbódultak, kivettük őket a kádból, fejüket letakartuk és ivarnyílásukat szárazra töröltük, ezek után műanyag kémcsövekbe vagy üvegpohárba történt a sperma lefejeése, ügyelve arra, hogy vizelet ne szennyezze az ivarterméket (16. sz. ábra).

Ezt követte a sperma vizsgálata, melynek során szubjektív módon megállapítottam:

- a haladó mozgást végző spermiumok %-os arányát,
- a haladó mozgás idejét (másodpercben),
- a mozgás intenzitását.

Amennyiben a sperma minősége megfelelő volt (70-80%-os motilitást tapasztaltam) felhasználtam a további munkára.



16. sz. ábra: Ponty tejes fejése (fotó: Urbányi B., 2004)

3.2.5. Az ikrások fejése

Hormonális kezelést követően fontos szempont, hogy az ovuláló halak ne szórják el ikrájukat a tartómedence padlójára, így ezt a problémát a keltetőházi gyakorlatnak megfelelően az ivarnyílás bevarrásával oldottuk meg.



17. sz. ábra: Ponty ikrás fejése (fotó: Szabó T., 2005)

Így a halak elaltatása és hasfaluk szárazra törlése után első dolgunk a varratok eltávolítása volt. Ez után az ivarnyílást szárazra töröltük, és a hasfalra gyakorolt kaudális irányú határozott, de egyben óvatos nyomással lefejtük az ikrát, így az ivartermék száraz műanyag tálakba került (17. sz. ábra).

3.2.6. A sperma mélyhűtése

A sperma hűtéséhez ötféle hígítót használtam fel.

1. 350 mM glükóz, 30mM TRIS (pH 8.0)
2. 350 mM fruktóz, 30mM TRIS (pH 8.0)
3. 300 mM szaharóz, 30mM TRIS (pH 8.0)
4. 200 mM KCl, 30mM TRIS (pH 8.0)

5. Ponty hígító (Magyary et al. 1996a) amely 1000 ml-re tartalmazott
350mg NaCl
1000mg KCl
22mg $MgCl_2$
20mg $NaHCO_3$

Védőanyagként 10% dimetilszulfoxidot (DMSO) és 10% metanolt használtam végső koncentrációban.

Hűtés előtt a spermiumokat 1:9-hez hígítottam, mégpedig a következő arányban:
1 adag sperma,
1 adag védőanyag,
8 adag hígító.

A mélyhűtésig a spermiumokat 4 °C körüli hőmérsékleten hűtőben tároltam. A 2 védőanyag és az 5 különböző hígító 10 kombinációt adott összesen. Így a hűtésre szolgáló műszalmákat különböző színű és számú csíkozással láttam el, és mindegyik kombinációból 4 ismétlést végeztem. A mintákat 500 μ l-es (0,5ml-es) műszalmákba automata pipettával szívtam fel. A DMSO-s minták esetében 10 perces egyensúlyozási idővel dolgoztam, míg a metanolos mintáknak a hűtését azonnal elvégeztem.

A hűtés hordozható polisztirol dobozban folyékony nitrogén gőzébe történt. A műszalmákat a folyékony nitrogén szintjén úszó 3 cm magas polisztirol kereten helyeztem el, majd 3 perc elteltével a nitrogénbe dobtam a mintákat.

A hűtés után azonnal megkezdtem a minták felolvasztását a felolvasztás utáni motilitás vizsgálata céljából, ami 40 °C-os vízben történt 13 másodpercig. Minden mintánál megvizsgáltam a minták vízzel való aktiválhatóságát és a haladó mozgást végző spermiumok %-os arányát.

3.2.7. A mélyhűtött spermával végzett termékenyítés

A nőtényektől nyert ikrát először 10g-os adagokba mértem ki, ami kb. 8000 db ikrát jelent, és ezt száraz műanyag edényekbe tettem. Ezután 2-3 ml vizet adtam az ikrához, majd hozzáadtam a felolvasztott spermát. A termékenyítést követő 1-2 perces keverés után hozzáadtam a Woynárovich-féle oldatot (0,3% karbamid, 0,4% NaCl) melyben 1 órán át kevergettem.

Közben megvizsgáltam az ikra termékenyülését 4-8 sejtes állapotban. A ragadósság elvételének utolsó fázisa az 5 %-os tanninos fürdő volt 2 x 20 másodpercig. Az ikrát ezután 7 literes Zuger edényekben helyeztem el ügyelve a megfelelő átfolyási sebesség beállítására. Keléskor megszámoltam a kikelt lárvák arányát.

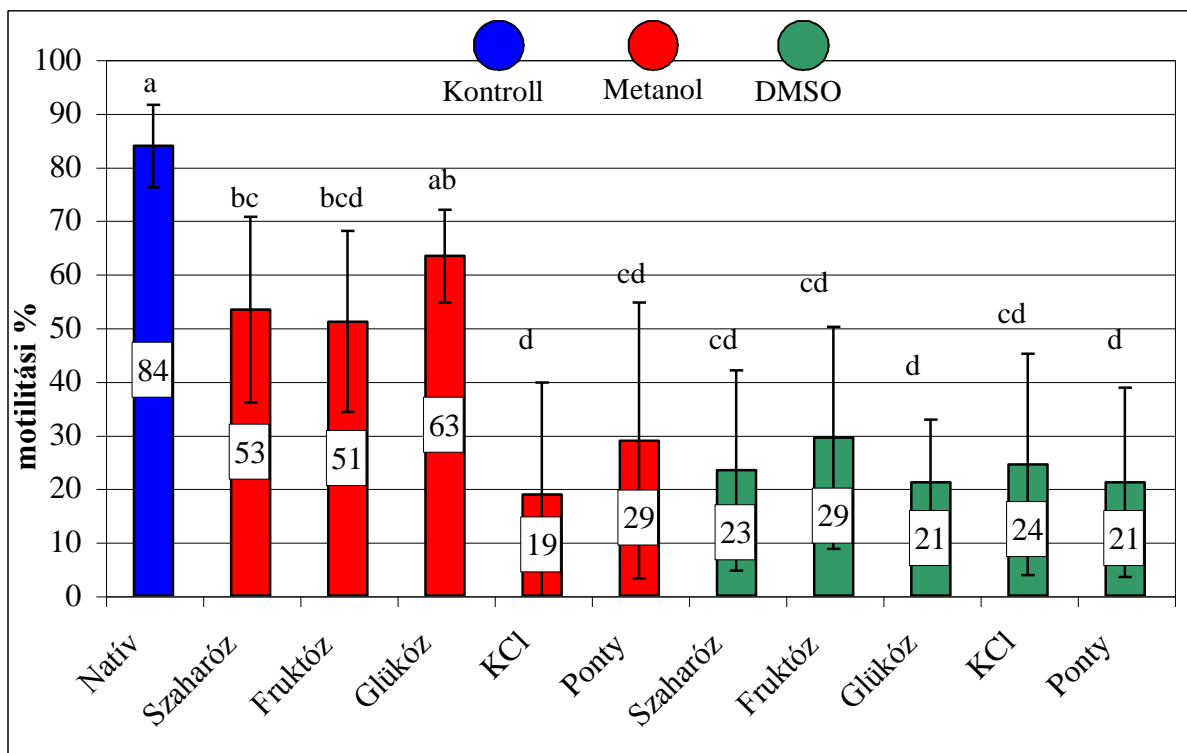
3.2.8. Az eredmények statisztikai feldolgozása

A kapott motilitási, termékenyülési, valamint kelési eredmények közti különbségeket $p \leq 0,05$ szignifikanciaszint mellett egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltam, Turkey-Kramer-próbát használva utótesztként. Az adatok normális eloszlását Kolmogorov-Szmirnov-próbával ellenőriztem. Az adatok biometriai feldolgozásához a GraphPad InStat Version 3.01 for Windows statisztikai szoftvercsomagot használtam.

3.2.9. A kísérletek eredményei

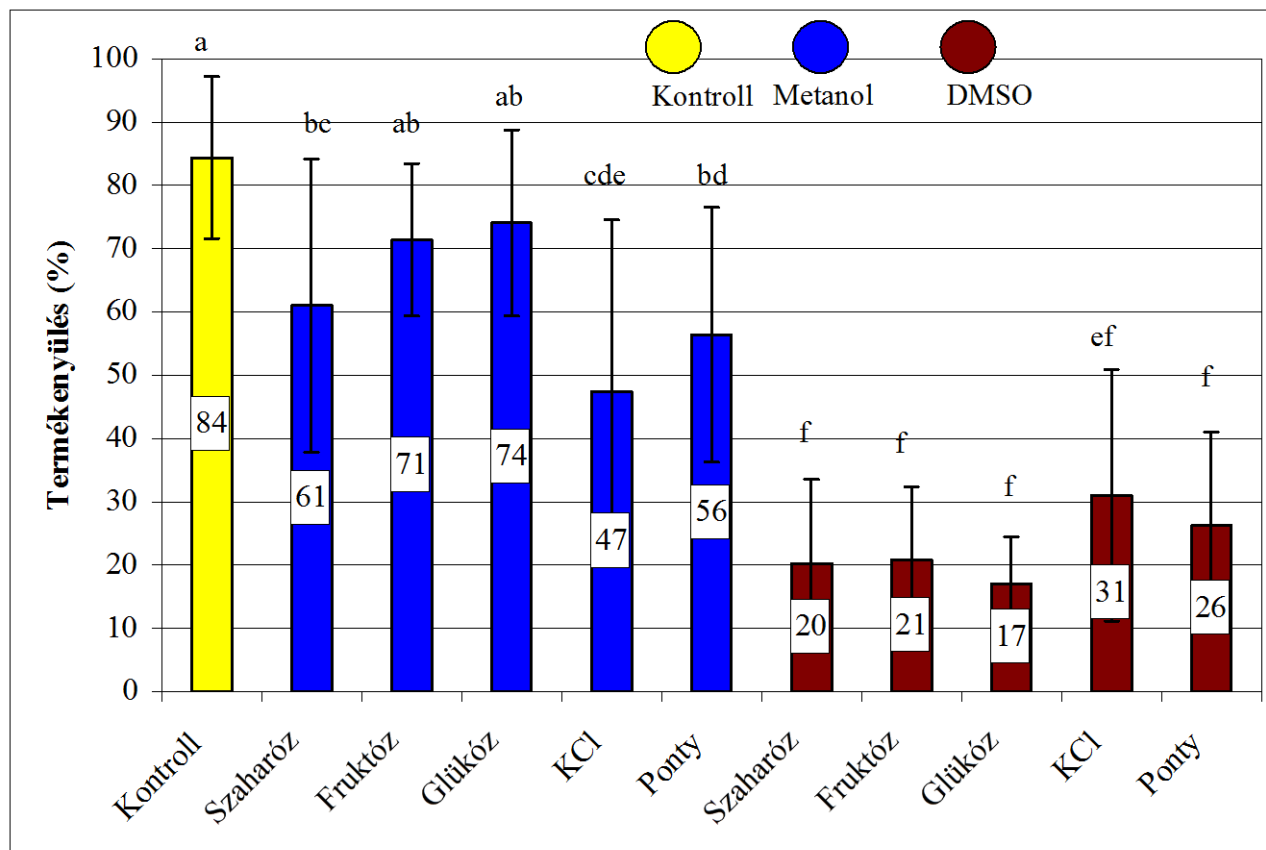
A tejes egyedek oltását követően minden alkalommal, minden egyed megfelelő mennyiségű (5-15 ml) spermát adott. Az ikrások úgyszintén kivétel nélkül reagáltak a hormonális indukcióra.

A friss sperma motilitása a kontrollnál $84 \pm 7\%$ volt $n=45$ ismétlésszámmal. A **legmagasabb felolvasztás utáni motilitást** ($63 \pm 9\%$ $n=29$) a glükóz hígító és a metanol mint védőanyag adta (18. sz. ábra). Statisztikailag nem volt kimutatható különbség a kontroll és a metanol-glükóz kombinációja között. A többi hígító alkalmazása metanollal nem adott ilyen magas motilitási értéket. Azonban elmondható, hogy a metanolos minták általában jobbnak bizonyultak, mint amikor DMSO-t használtam védőanyagként.



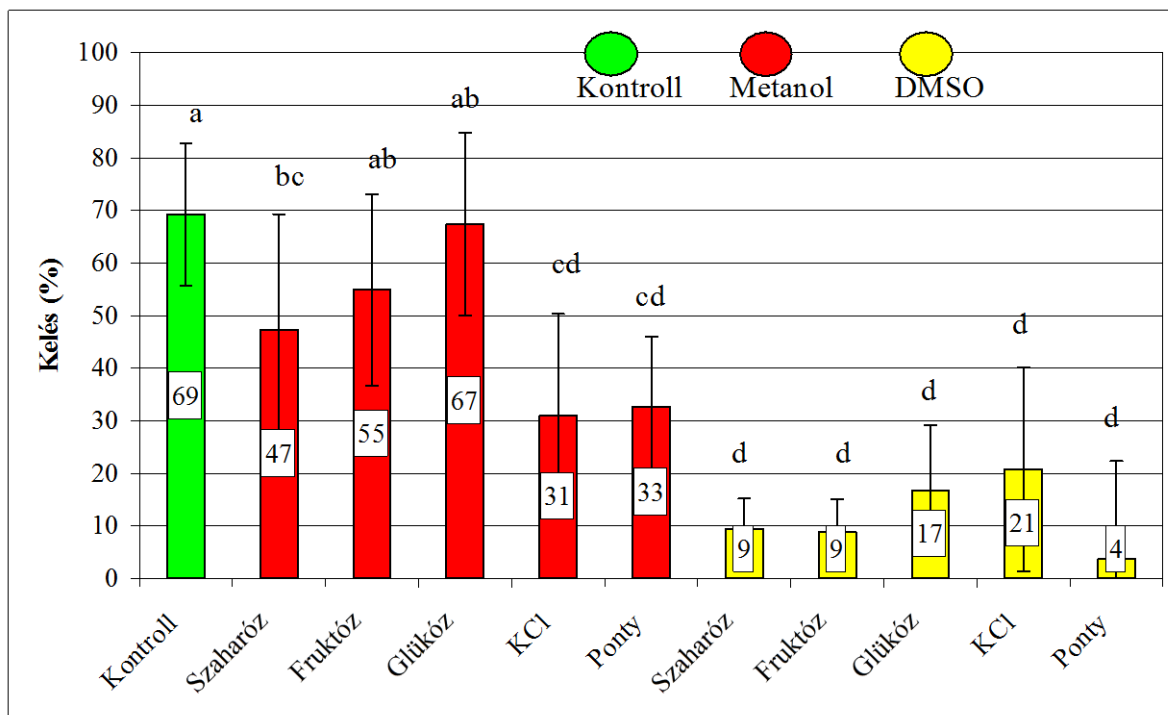
18. sz. ábra: A mélyhűtött pontysperma felolvasztás utáni motilitás eredményei. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek ($n=29$, kontroll: $n=45$).

A **legjobb termékenyülést** 4-8 sejtes állapotban, $74 \pm 15\%$ -ot (kontroll értéke $84 \pm 13\%$) $n=22$ ismétlés számmal a metanol védőanyag és glükóz hígító adta (19. sz. ábra). Statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam a kontroll és a fruktóz, illetve glükóz minták között metanol védőanyag használata mellett. Azonban az kijelenthető, hogy amikor metanolt használtam védőanyagként mindig jobb eredményeket kaptam, mint a DMSO védőanyaggal hűtött minták esetében.



19. sz. ábra: Mélyhűtött pontyspermával kapott termékenyülési eredmények. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek (n=22).

A **legjobb kelési eredményt** ($67 \pm 17\%$, n=22) megint csak a glükóz, mint hígító és metanol mint védőanyag kombinációjánál kaptuk (20. sz. ábra). Itt a kontroll eredménye $69 \pm 14\%$ volt. Az eredmények statisztikai feldolgozását követően hasonló megállapítást tehettem, mint a termékenyítési eredmények esetében, ugyanis itt sem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll, és a fruktóz-metanol, glükóz-metanol kombinációk között. A metanolos mintákkal kapott eredmények ebben az esetben is felülmúlják DMSO használata során kapottakat.



20. sz. ábra: Mélyhűtött pontyspermával kapott kelési eredmények. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek (n=22).

3.2.10. Következtetések

A **pontysperma mélyhűtése a mai napig problémás kutatási terület**, mivel a számos próbálkozás ellenére keveseknek sikerült találni olyan biztos és hatékonyan működő módszert, amellyel megfelelő, a kontrollal megegyező termékenyülést értek volna el.

A hordozható mélyhűtési módszer optimalizálására végzett kísérleteim során megállapítottam, hogy **motilitási értékek alapján nem határozható meg megfelelő hígító védőanyag, illetve hígítási arány**. Egyik kombináció sem adott egyértelmű eltérést a motilitási értékekben, amire kijelenthetném, hogy a kapott eredmények megfelelőek.

A termékenyítési eredmények alapján viszont kijelenthető hogy a **legjobb védőanyagnak a metanolt** találtam, ez mind az öt hígítóval elfogadható eredményt adott. **Glükóz** esetében tapasztaltam a legjobb eredményeket, itt **74%-os termékenyítési értéket** kaptam, míg a leggyengébbet a KCl esetében, itt 47%-os értéket kaptam, mely érték is magasabb volt, mint bármelyik kombináció, ahol védőanyagként DMSO-t használtam.

A DMSO esetében azt tapasztaltam, hogy a KCl -dal végzett hígítás esetén értem el a legmagasabb termékenyítést, 31%-ot. Ezzel ellentétben a metanol esetén ez a hígító bizonyult a legkevésbé eredményesnek.

A korábbi publikációkból kiderül, hogy az eddigi kutatások során igen sok szerző (Kurokura et al., 1984; Moczariski, 1977; Koldras és Bieniarz, 1987) nagy

jelentőséget tulajdonított a DMSO-nak. Azonban a más halfajoknál – harcsa és pisztrángféléknél – elért sikeres eredmények (Lahnsteiner et al., 1995; Steyn és Van Vuren, 1987) alapján akartam kipróbálni a metanolt, mint védőanyagot, és az elért eredmények azt mutatják, hogy kísérleteim eredményesnek bizonyultak. Metanollal végzett kísérletek eredményei nemcsak jobbak, de kiegyenlítettebbek is, mint a DMSO esetében.

Hígítási aránynak **1:9 hígítási arány bizonyult a legjobbnak**, míg a szakirodalomból kiderül, hogy alkalmaztak 1:1, illetve 1:6 -os hígítási arányokat (Moczarski, 1977). Korábbi társszerzős közleményemben egyes pontyfélék hatékony mélyhűtéséhez elengedhetetlen a legalább 1:5 arányú hígítás (Lahnsteiner et al., 2000).

Metanol esetében a hígítás után azonnal megkezdtem a hűtést, míg a DMSO esetén 10 perces equilibrációval számoltam és csak ezután történt a sperma hűtése. Más szerző is alkalmazott equilibrációt, Moczarski (1977) esetében 6 másodperctől 5-6 percig tartott, míg Sneed és Clemens (1956) is említést tesz az equilibrációról, bár pontos adatokkal nem szolgálnak.

Hűtés után a mintákat azonnal kiolvastottam és megvizsgáltam azokat. A minták felolvasztását természetesen egyenként végeztem. Ezt **40 °C-os vízfürdőben végeztük 13 másodpercig**, míg Lubzens et al. (1993) 25 °C-on 2-3 percig, Moczarski (1977) 20-60 °C-on, illetve 0 és 20 °C-on. Kurokura et al. (1984) esetében 23 °C bizonyult megfelelőnek.

A mintáknak a motilitását vizsgáltam, de nem vizsgáltam a mozgás idejét, sem intenzitását, sem a motilitás egyéb paramétereit. A megfelelőnek talált mintákkal termékenyítést végeztem, majd **a termékenyülést 4, 8 sejtés állapotban vizsgáltam és keléskor pedig a kelési arányt detektáltam**. A termékenyítés során 1 műszalmányi spermát 10g (kb. 8000-9000db) ikrához kevertem, míg Kurokura et al. (1984) 1ml-1g, illetve 1ml-50g kombinációt alkalmazott, Zhukhinsky (1981) pedig 3,5g ikrához 0,135, illetve 2ml spermát használt termékenyítésre.

Az általam használt kombinációk **közelebb állnak a gyakorlati alkalmazáshoz** ugyanis 1 műszalmával (0,5ml 10-szeres hígítással) 10g ikrát tudtam termékenyíteni, ami már félüzemi szinten eredményesen felhasználható. Eredményeim **megbízhatóságát** nagymértékben **alátámasztja a magas ismétlésszám**.

A cukoralapú hígítók esetében azt tapasztaltam, hogy felolvasztás után a sperma **zselés gélszerű állapotot vett fel**, függetlenül az alkalmazott védőanyagtól, míg ezt a só alapú hígítóknál nem tapasztaltam. Más szerzők publikációiban erre utalást nem találtunk, konzultációk során (Lahnsteiner, személyes közlés, 2002) jutottam ahhoz az információhoz, mely szerint mások is találkoztak ezzel a jelenséggel, bár akkor nem végeztek termékenyítést a mélyhűtött spermával. Eredményeim szerint ez az agglutináció nem befolyásolja a termékenyülési, illetve kelési eredményeket.

A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a ponty sperma mélyhűtése során **több olyan tényező is optimalizálásra került**, melyek kipróbálása más halfajokon a **módszertan egységesítési törekvéseit segíti**. Ilyen tényezők: a hűtőmedium összetétele (glükóz és metanol), a hűtés metodikája (1:9 hígítási arány, 3 cm magas polisztirol keret, 3 perces hűtési idő).

3.2.11. Javaslatok

- Javaslom a ponty spermájának mélyhűtéséhez a cukor – elsősorban glükóz – alapú hígítók használatát.
- Javaslom a pontysperma mélyhűtéséhez a metanol védőanyag alkalmazását az általánosan használt DMSO helyett.
- Javaslom későbbiekben növelni az egy műszalmányi mélyhűtött spermával termékenyített ikra mennyiségét, mivel feltevésem szerint ennek felső határát még nem értük el.
- Javaslom a nagyobb méretű műszalmák (1,2ml és 5ml) kipróbálását a ponty spermájának mélyhűtéséhez, mivel így növelhető az egy egységben lehűthető sperma mennyisége.
- Javaslom az optimalizált mélyhűtési módszer génbanki felhasználását, részben hazai, részben külföldi megőrzési tevékenységek elvégzésére.
- Javaslom a hűtőmédium, a hűtési módszer alkalmazhatóságának további vizsgálatát a mélyhűtés standardizálásának fejlesztésében.

3.3. Kísérleti munka és eredmények bemutatása pontyféléken

3.3.1. Bevezetés, a munka indokoltsága

A 2000. február 1. és 12. között a Szamoson és a Tiszán végigvonuló cián- és nehézfém-szennyezés jelentős kárt okozott a magyar folyóvízi ökoszisztémának, amely leglátványosabban a halak tömeges pusztulásában jelent meg. Ez a katasztrófa eredményezte azt, hogy tanszékünk több olyan programot indított, mely a kárt szenvedett halpopulációk egyes fajainak szaporodásbiológiai státuszának vizsgálatára, ezen belül a hímivarsejtek mélyhűtésére fókuszált.

A **környezeti katasztrófa inspirálta kutatómunka** elején szembesültem azzal a ténnyel, hogy milyen csekély irodalom áll rendelkezésre az ún. egyéb pontyfélék ivarsejt mélyhűtését illetően. Viszont a pontyon szerzett tapasztalatok és gyakorlat elegendő kiindulási alapot biztosított, és több olyan fogást és módszert lehetett a munkám során alkalmazni, ami a pontyon már bevált és működött. Így a standardizálás első lépéseit ezeken a fajokon végzett kísérleti munka során végeztem-végezhettem el.

3.3.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása

A folyóvízi pontyféléken végzett kutatómunkám 2000-2006. közötti időszakban folyt, kísérleteim során **négy, hazai vizeinkben is megtalálható pontyfélével**, a bodorkával (*Rutilus rutilus*, 21. sz. ábra), karikakeszeggel (*Blicca bjoerkna*, 22. sz. ábra), dévérkeszeggel (*Abramis brama*, 23. sz. ábra) és a márnával (*Barbus barbus*, 24. sz. ábra) dolgoztam.



21. sz. ábra: Bodorka (forrás: <http://tankonyvtar.hu>)



22. sz. ábra: Karikakeszeg (forrás: <http://tankonyvtar.hu>)



23. sz. ábra: Dévérkeszeg ikrás egyed oltás közben (fotó: Szabó T., 2003)



24. sz. ábra: Mára (forrás: <http://tankonyvtar.hu>)

Az egyedek minden évben **Ercsi mellett a Dunából kerültek lehalászásra**, majd átszállították őket a **Temperáltvízű Halszaporító és Kereskedelmi Kft. (TEHAG)** százhalombattai gazdaságába. A bodorkán, dévérkeszegen, karikakeszegen és márnán folytatott kísérleteimet ezen a helyszínen, a halak számára megfelelő környezeti feltételek (vízminőség, hőmérséklet) mellett végeztem el minden év tavaszán, a szaporítási időszakban.

3.3.3. Az oltás

Az ivartermék kinyerése érdekében mind a négy faj esetében **hormonális indukciót** alkalmaztam. A hormonkezelés célja, hogy fejésre alkalmas, ovulált, megfelelő mennyiségű „folyós” ikra és kellő mennyiségű és minőségű sperma álljon rendelkezésre. Az ovuláció és a spermiáció kiváltásához 26 °C víz hőmérséklet mellett szárított pontyhipofízist használtam. A hormonkészítményt halfiziológias sóoldatban (0,65%-os NaCl) szuszpendáltam el, a hím egyedek közül a bodorka és a karikakeszeg tejesek esetében 2mg/ttm kg, dévérkeszeg és mára esetén 3mg/ttm kg-ot számolva.

Az ikrásokat 4mg/ttm kg pontyhipofízissal kezeltem, kivéve a márnát, ekkor 5mg/ttm kg volt az arány.

Az így nyert szuszpenziót steril orvosi fecskendővel és tűvel egy adagban a hasúszó eredési pontjánál a halak hasüregébe juttattam.

3.3.4. Az ikrások fejése

Az ovuláció az injekció után 12 órával következik be a bodorka és a karikakeszeg anyáknál, illetve 10 órára van szükség a dévérkeszeg esetében. A márna a hormonkezelést követően 22 órával ovulál és áll készen a fejésre. Az ivartermék elvétele az ivarnyílás szárazra törlése után a hasfalra gyakorolt kaudális irányú nyomással történt. A sikeresen kezelt nőtények ikráit száraz műanyag tálba fejem, és letakarva szobahőmérsékleten tartottam. Törekedtem a minél hamarabbi felhasználásra.

3.3.5. A tejesek fejése

A hímektől a spermát száraz műanyag kémcsövekbe fejem, ügyelve arra, hogy fejés közben vizelet ne szennyezze.

A spermából mintát vettem, tárgylemezre cseppentettem, majd vízzel aktiváltam. Ezután fénymikroszkóppal (Zeiss Laboval, Carl Zeiss, Jena, NDK) 200-szoros nagyításon megvizsgáltam a minőségét. Szubjektív módon megállapítottam:

- a haladó mozgást végző spermiumok %-os arányát,
- a haladó mozgás idejét (másodpercben),
- a mozgás intenzitását

A minimum **80-90%-os motilitást elérő spermát használtam fel a kísérletekhez**, az ivarterméket felhasználásig 4 °C-on tároltam.

3.3.6. A spermamélyhűtés folyamata

A hűtőmedium két összetevője a hígító és a fagyásvédő anyag.

A sperma hígítását a hűtőmediumokkal 1:9 arányban, Eppendorf csövekben végeztem el. Kísérleteinkben az **alábbi hígítókat** használtam fel:

1. 350 mM glükóz, 30mM Tris (pH 8.0)
2. 350 mM fruktóz, 30mM Tris (pH 8.0)
3. 300 mM szacharóz, 30mM Tris (pH 8.0)
4. 200 mM KCl, 30mM Tris (pH 8.0)
5. módosított Kurokura-féle hígító: 350 mg NaCl, 1000 mg KCl, 22 mg CaCl₂, 8 mg MgCl₂, 20 mg NaHCO₃ 100 ml vízben (Magyary et al.1996a)

Védőanyagként 10% dimetil-szulfoxidot (DMSO) vagy 10% metanolt használtam végső koncentrációban. Így 10 különböző összetételű hűtőmedium vizsgálatát végezhettem el.

A mintákat 0,25 ml ürtartalmú műszalmába szívtam fel. Minden kombinációból 4 szalmát hűtöttem. A szalmák jelölésére színes alkoholos filctollat használtam.

A DMSO védőanyag használatakor egyensúlyozási időre van szükség. A védőanyag koncentráció kiegyenlítődése az extracelluláris és intracelluláris tér

között 10 perc alatt megtörténik. Az egyensúly idejére ezeket a mintákat hűtőszekrénybe helyeztem.

A hűtéshez **folyékony nitrogént** használtam. A nitrogént hőszigetelt tartályokban tároltam, a kísérlet során **polisztirol dobozba** töltöttem ki. Ezután a folyadék felszínére 3 cm vastagságú polisztirol keretet helyeztem, és erre tettem a szalmákat, így a hűtés a folyékony nitrogén gőzében történik. A hűtési idő 3 perc, lejárta után a mintákat a nitrogénbe dobtam. A szalmák a nitrogéntartályban $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on korlátlan ideig tárolhatók.

A **műszalmákban** lévő sperma felolvasztását 40°C -os vízfürdőben végeztem 5 másodpercig. Felolvasztás után ismét motilitás vizsgálatot végeztem és a spermát azonnal felhasználtam, mivel a spermiumok a natívtól eltérő mozgást mutathatnak és a sperma termékenyítőképesége általában gyorsan csökken.

3.3.7. Termékenyítés

A termékenyítéshez minden halfaj esetében **kevert ikrát alkalmaztam** a termékenyítéskor, csökkentve az esetleges gyengébb minőségű ikra negatív hatását. Az ikrát kis műanyag edényekbe osztottam szét, ez a mennyiség 1 gramm volt a keszegeknél, 4 grammos adagokat használtam a bodorkánál és 5 grammos adagokra osztottam szét a márna ikrát. Minden adaghoz 1 műszalma tartalmát adtam hozzá. Egy adagot mindig friss spermával termékenyítettem, ez volt a kontroll csoport, mellyel ellenőriztem az ikra minőségét.

Az ivartermékek összekeverése után **az aktivációt** $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékletű vízzel végeztem, az edény finom mozgatása közben. A **termékenyülési százalék** megállapítását 4-8 sejtes állapotban végeztem. Ez a bodorkánál, a dévérnél és a karikakeszegnél a termékenyítést követően 2 órával, a márnánál 3 órával utána következik be.

Az ikraadagokból mintát vettem és mikroszkóp alatt megszámláltam a nem termékenyült, torz, illetve a látótérben lévő összes ikraszemet. A nem termékenyült ikrák animális pólusa is osztódhat (pszeudoparthenogenezis), az utódsejtek azonban nem egyenértékűek; az osztódás egyenetlen. Morula állapotban a szabálytalan sejtek már alig felismerhetően aprók, ezért ebben a szakaszban a termékenyülési százalék meghatározása igen nehéz. A szabálytalanul osztódó sejtek egy idő után természetesen szétesnek, ez nagyjából arra az időszakra tehető, mikor a termékeny sejtek gasztrula állapotba érnek. A termékenyülési százalékot tehát vagy korai osztódási állapotban, vagy gasztrula állapotban célszerű meghatározni (H. Tamás et al., 1982).

A számolást 3 látótérben, 3x ismételttem meg, közben többször végeztem vízcserét. A vizsgálat után az inkubációt **7 literes Zuger üvegekben** végeztem, megfelelő vízhőmérséklet ($26\text{ }^{\circ}\text{C}$) és vízátfolyás mellett.

Kelés után megvizsgáltam a kikelt lárvák arányát, a számolást ebben az esetben is 3x ismételttem 3 látótérben, ebből megállapítottam a **kelési százalékot**.

3.3.8. Az adatok statisztikai feldolgozása

Az adatok statisztikai feldolgozását a GraphPad Prism 4.0 és GraphPad InStat 3.01 verziószámú statisztikai programcsomag segítségével végeztem. Vizsgáltam, hogy a használt védőanyag és hígító milyen mértékben befolyásolja felolvasztás utáni motilitási, termékenyülési és kelési eredményeket. Ehhez kétszemponthus varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk $P < 0,05$ szignifikanciaszint mellett. Emellett

lineáris regressziót végeztem, hogy feltárjam a felolvasztás utáni motilitás és a termékenyülés, illetve kelés közötti lehetséges korrelációkat.

3.3.9. A kísérletek eredményei

A friss spermára vonatkozó motilitási eredmények vizsgálatánál az alábbi értékeket kaptam: bodorka: $95 \pm 0\%$ ($n=26$), dévérkeszeg: $79 \pm 9\%$ ($n=24$), karikakeszeg: $87 \pm 15\%$ ($n=15$), márna: $69 \pm 27\%$ ($n=16$).

Mindegyik faj esetében kiválogattam a **legjobb 10 mintát**, és azzal dolgoztam tovább, melynek eredményeképpen: bodorkánál $95 \pm 0\%$, dévérkeszegnél $82 \pm 8\%$, karikakeszegnél $94 \pm 3\%$, míg márnánál a motilitás: $86 \pm 8\%$ értéket adott.

A **felolvasztott sperma motilitás értékei** a különböző krioprotektánsok függvényében: 3. sz. táblázat mutatja be.

3. sz. táblázat: A bodorka (a. $n=10$), a dévérkeszeg (b. $n=10$), a karikakeszeg (c. $n=10$) és a márna (d. $n=10$) felolvasztás utáni spermamotilitása 5 hígító (fruktóz, glükóz, szacharóz, KCl és módosított Kurokura) és 2 védőanyag (metanol és DMSO) használatát követően. A sorokon belül azonos betűvel jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$). Az oszlopokon belül azonos számmal jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$).

a. Bodorka					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	70 ± 10^{a1}	77 ± 6^{a1}	67 ± 6^{a1}	47 ± 6^{a2}	53 ± 6^{a2}
DMSO	53 ± 6^{b1}	57 ± 6^{b1}	53 ± 6^{a1}	23 ± 6^{b3}	37 ± 6^{b2}
b. Dévérkeszeg					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	77 ± 6^{a1}	77 ± 6^{a1}	70 ± 0^{a2}	57 ± 6^{a2}	67 ± 6^{a2}
DMSO	72 ± 3^{a1}	72 ± 3^{a1}	60 ± 0^{a1}	50 ± 10^{a2}	57 ± 6^{a12}
c. Karikakeszeg					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	55 ± 6^{a2}	67 ± 5^{a1}	60 ± 0^{a12}	40 ± 0^{a3}	53 ± 5^{a2}
DMSO	40 ± 8^{b12}	50 ± 11^{b1}	45 ± 6^{b1}	20 ± 8^{b3}	30 ± 8^{b23}
d. Márna					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	50 ± 8^{a2}	75 ± 6^{a1}	55 ± 6^{a2}	40 ± 8^{a2}	50 ± 8^{a2}
DMSO	43 ± 5^{a2}	60 ± 11^{a1}	43 ± 10^{a2}	25 ± 13^{a3}	40 ± 11^{a2}

A legmagasabb felolvasztás utáni motilitás a bodorkánál volt megfigyelhető, metanol védőanyag és glükóz hígító kombinációnál ($77 \pm 6\%$) (3.a. táblázat). A motilitás szempontjából a két védőanyag között minden hígító esetében statisztikailag szignifikáns különbséget állapítottunk meg ($P < 0.0001$). A metanollal kezelt minták jobbnak bizonyultak, mint amikor DMSO-t használtunk védőanyagként.

Dévérkeszeg esetében (3.b. táblázat) a glükóz ($77 \pm 6\%$) és a fruktóz ($77 \pm 6\%$) hígító metanol védőanyaggal való kombinációja adta a legjobb eredményt.

Fagyásvédők ($P=0.0014$) és hígítók ($P < 0.0001$) között statisztikailag szignifikáns különbséget találtam felolvasztás után a sperma motilitásában.

Glükóz és metanol kombinációja eredményezte a felolvasztás utáni legnagyobb motilitási értéket karikakeszegnél ($67\pm 5\%$) és a márnánál ($75\pm 6\%$) (3.c. és 3.d. táblázat).

A **termékenyítési eredményeket** mutatja be a 4. sz. táblázat. A kontroll csoport termékenyülési eredményei, amelynél friss spermát alkalmaztunk, a következők voltak: bodorka: $90\pm 5\%$, dévérkeszeg: $87\pm 8\%$, karikakeszeg: $63\pm 3\%$, márna: $84\pm 4\%$.

Két fajnál szignifikáns különbséget találtam a hígítók (karikakeszeg és márna: $P<0.0001$) és a védőanyagok között (karikakeszeg: $P<0.0001$, márna: $P=0.0005$).

Három fajnál a legnagyobb termékenyülési eredményt a glükóz hígító és metanol védőanyag alkalmazásával értem el (bodorka: $84\pm 4\%$, karikakeszeg: $63\pm 2\%$ és márna: $70\pm 4\%$), kivétel volt a dévérkeszeg, ahol a metanollal a fruktóz hígító alkalmazása mutatta a legmagasabb értéket ($83\pm 2\%$).

Megállapítottam, hogy a hígítók ($P<0.0001$ minden fajnál) és a fagyásvédők között (bodorka és karikakeszeg: $P<0.0001$, dévérkeszeg és márna: $P=0.0005$) is szignifikáns különbségek vannak a termékenyülési eredményekre nézve.

Összefoglalva elmondhatom, hogy minden halfaj esetében a motilitásra vonatkozóan a metanol fagyásvédő esetében kaptam magasabb értékeket, illetve a hígítók szempontjából a glükóz, egy esetben pedig a fruktóz mutatott jobb eredményt.

4. sz. táblázat: A bodorka (a. n=10), a dévérkeszeg (b. n=10), a karikakeszeg (c. n=10) és a márna (d. n=10) mélyhűtött spermájával kapott termékenyülési eredmények 5 hígító (fruktóz, glükóz, szacharóz, KCl és módosított Kurokura) és 2 védőanyag (metanol és DMSO) használatát követően. A sorokon belül azonos betűvel jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$). Az oszlopokon belül azonos számmal jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$).

a. Bodorka					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	78 ± 6^{a1}	84 ± 4^{a1}	76 ± 6^{a1}	53 ± 4^{a2}	61 ± 5^{a2}
DMSO	67 ± 3^{a1}	71 ± 4^{b1}	66 ± 5^{a1}	35 ± 5^{b3}	44 ± 6^{b2}
b. Dévérkeszeg					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	83 ± 2^{a1}	79 ± 2^{a12}	61 ± 8^{a34}	52 ± 6^{a4}	70 ± 1^{a23}
DMSO	75 ± 5^{a1}	72 ± 6^{a12}	58 ± 8^{a3}	46 ± 4^{a4}	64 ± 5^{a23}
c. Karikakeszeg					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	56 ± 4^{a2}	63 ± 2^{a1}	57 ± 2^{a12}	44 ± 3^{a3}	51 ± 2^{a23}
DMSO	46 ± 7^{b1}	52 ± 6^{b1}	48 ± 2^{b1}	27 ± 4^{b2}	33 ± 2^{b2}
d. Márna					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	57 ± 6^{a123}	70 ± 4^{a1}	61 ± 4^{a12}	46 ± 11^{a3}	51 ± 8^{a23}
DMSO	51 ± 6^{a12}	63 ± 5^{a1}	52 ± 9^{a12}	32 ± 11^{a3}	40 ± 8^{a23}

A **kelési eredményeket** mutatja be az 5. sz. táblázat. Kontroll csoport kelési eredményei: bodorka: $79 \pm 2\%$, dévérkeszeg: $68 \pm 7\%$, karikakeszeg: $60 \pm 2\%$, márna: $75 \pm 3\%$.

Mélyhűtött sperma alkalmazását követően, hasonlóan a termékenyülési eredményekhez, a kelési eredményeknél is a metanol védőanyag és a glükóz hígító kombináció adta a legnagyobb értéket 3 halfaj esetében: bodorka $74 \pm 2\%$, karikakeszeg $54 \pm 2\%$, márna $61 \pm 4\%$. Kivétel itt is a dévérkeszeg volt, ahol a fruktóz és metanol párosítás eredményezte a legmagasabb kelési százalékokat: $67 \pm 6\%$.

A kelés szempontjából a hígítók között statisztikailag értékelhető különbséget találtam ($P < 0.0001$). A fagyásvédő anyagokat vizsgálva az eredmények között szignifikáns különbséget a bodorka esetében nem találtam ($P = 0.1388$), viszont a másik három halfajnál igen ($P < 0.0001$ mindhárom fajnál).

Mind a négy halfajnál **erős korrelációt találtam a motilitási és a termékenyülési százalék között** (bodorka: $r = 0.9661$, $n = 30$, $P < 0.0001$; dévérkeszeg: $r = 0.8199$, $n = 30$, $P < 0.0001$; karikakeszeg: $r = 0.9535$, $n = 40$, $P < 0.0001$; márna: $r = 0.9315$, $n = 40$, $P < 0.0001$).

Hasonlóképpen **erős korreláció állapítható meg a felolvasztott sperma motilitása és a kelési eredmények között** mind a bodorka ($r = 0.9418$, $n = 30$, $P < 0.0001$), a dévérkeszeg ($r = 0.7703$, $n = 30$, $P < 0.0001$), a karikakeszeg ($r = 0.9366$, $n = 40$, $P < 0.0001$) és a márna ($r = 0.8879$, $n = 40$, $P < 0.0001$) halfajnál egyaránt.

5. sz. táblázat: A bodorka (a. $n = 10$), a dévérkeszeg (b. $n = 10$), a karikakeszeg (c. $n = 10$) és a márna (d. $n = 10$) mélyhűtött spermájával kapott kelési eredmények 5 hígító (fruktóz, glükóz, szacharóz, KCl és módosított Kurokura) és 2 védőanyag (metanol és DMSO) használatát követően. A sorokon belül azonos betűvel jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$). Az oszlopokon belül azonos számmal jelölt értékek szignifikánsan nem különböznek ($P > 0.05$).

a. Bodorka					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	71 ± 4^{a1}	74 ± 2^{a1}	70 ± 3^{a1}	45 ± 3^{a2}	53 ± 4^{a2}
DMSO	61 ± 2^{b1}	64 ± 5^{b1}	60 ± 6^{a1}	29 ± 4^{b3}	37 ± 6^{b2}
b. Dévérkeszeg					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	67 ± 6^{a1}	66 ± 5^{a1}	57 ± 10^{a12}	46 ± 7^{a2}	63 ± 3^{a1}
DMSO	65 ± 8^{a1}	63 ± 6^{a1}	54 ± 7^{a1}	42 ± 2^{a2}	58 ± 4^{a1}
c. Karikakeszeg					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	47 ± 4^{a23}	54 ± 2^{a1}	48 ± 2^{a12}	37 ± 3^{a4}	43 ± 2^{a3}
DMSO	32 ± 5^{b1}	37 ± 4^{b1}	33 ± 1^{b1}	19 ± 3^{b2}	23 ± 1^{b2}
d. Márna					
	Fruktóz	Glükóz	Szacharóz	KCl	Módosított Kurokura
Metanol	50 ± 5^{a23}	61 ± 4^{a1}	54 ± 4^{a12}	41 ± 9^{a3}	45 ± 7^{a23}
DMSO	36 ± 4^{b12}	44 ± 3^{b1}	37 ± 6^{b12}	22 ± 8^{b3}	28 ± 6^{b23}

3.3.10. Következtetések

A pontyfélék spermamélyhűtésének megoldásával már régóta foglalkoznak a kutatók. A kísérletek nagy része természetesen a ponty fajra (*Cyprinus carpio* L.), mint az egyik legelterjedtebb gazdasági halfajra irányul. Az egyéb pontyfélékkel kapcsolatban nagyon kevés információ látott eddig napvilágot, ami a spermamélyhűtési lehetőségeket tárgyalja. **Tudomásom szerint** a bodorka és a karikakeszeg spermamélyhűtésére még egyáltalán nem született kísérlet és a dévérkeszeg hím ivartermékének hűtéséről is csak egy cikk számolt be (Glogowski et al., 1999b). Márna esetében is csak egy kísérletről tudok (magyar társszerzőséggel), habár itt a szerzők nem számoltak be termékenyülési eredményekről (Lahnsteiner et al., 2000).

A fenti információkat lehet magyarázni és el kell fogadni a tényt: **gazdaságilag kevésbé jelentős halfajok hímivarsejtjeinek mélyhűtése nem tart érdeklődésre számot** az ezen a kutatási területen munkálkodó szakemberek között. Kutatócsoportomat is a tiszai cián katasztrófát követően kezdte el foglalkoztatni a lehetőség, hogy a spermamélyhűtés nyújthat-e alternatív megoldást ezen halfajok genetikai állományának megőrzéséhez, valamint megpróbáltam kifejleszteni egy egységes mélyhűtési módszert ezen négy, hazai folyóvizekben megtalálható pontyfélére.

Munkám során **mindkét fagyásvédő anyagnál és a hígítók esetében** is szignifikáns különbséget találtam a felolvasztott sperma motilitását, illetve a termékenyülési és a kelési eredményeket vizsgálva. Ez a megállapítás az általam vizsgált halfajokon belül egyedül a dévérkeszeg esetében nem igaz, ahol a kelési eredményre vonatkozóan nem találtam szignifikáns különbséget a fagyásvédő anyagok között.

A **metanol, mint védőanyag alkalmazása bármely hígítóval jobb eredményeket adott, mint a DMSO-val való kezelések.** A pontyféléknél, elsősorban a pontynál az eddigi kísérletekben a leginkább használt védőanyag a DMSO volt (Moczarski 1977; Kurokura et al., 1984; Cognie et al., 1989; Glogowski et al., 1999b; Lahnsteiner et al., 2000; Linhart et al., 2000), igaz, a gödöllői laboratóriumunkban a ponty esetében már metanollal értek el jobb eredményeket (Horváth et al., 2003).

A metanolt sikeresen használták védőanyagként pisztrángféléknél (Lahnsteiner et al. 1997), harcsáknál (Steyn, 1993; Steyn és Van Vuren, 1987; Tiersch et al., 1994) és tilápián (Harvey, 1983). A fagyásvédők hatásmechanizmusa kevésbé ismert. Egy lehetséges magyarázatot a védőanyagok eltérő hatására vonatkozóan Tiersch et al., (1994) és Ogier de Baulny et al., (1997) adtak, akik megfigyelték, hogy a DMSO drasztikusan növeli a hígítók ozmolalitását, míg a metanol némileg csökkenti azt. Az ozmolalitás növekedése hiperozmotikus sokkot okozhat, így a sejteket nagyobb mértékű károsodás érheti a fagyasztás során, tehát ez a jelenség befolyásolja a mélyhűtés eredményességét.

Kísérleteimk során megfigyeltem, hogy **cukor alapú hígítókkal**, különösen a glükóz és a fruktóz alkalmazásakor **magasabb felolvasztás utáni spermamotilitás** érhető el, mint a só alapú hígítók használatakor. Egy kivételt csak karikakeszegnél, a

kelési eredmények esetében találtam, ahol a módosított Kurokura hígító nem mutatott statisztikailag szignifikáns különbséget a glükóz és a fruktóz hígítókhoz képest.

Glogowski et al. (1999b) ugyancsak úgy találta, hogy dévérkeszegnél a 0.3 M glükóz hígító eredményezi a legmagasabb termékenyülési százalékot szemfoltos stádiumban.

A cukoralapú hígítókat más pontyféléknél is alkalmazták, úgy mint a pontyon (Babiak et al., 1997; Warnecke and Pluta, 2003), indiai pontyfajokon (Kumar, 1988) és növényevő halakon (Zhang és Yun, 1991). A cukoralapú hígítók használatának eredményessége abban az ismert hatásukban keresendő, hogy jó extracelluláris krioprotektánsok, illetve jól bevált membrán-stabilizátorok.

A legmagasabb felolvasztás utáni motilitást, termékenyülési és kelési eredményeket mind a négy vizsgált faj esetében **fruktóz vagy glükóz hígító és metanol védőanyag kombinációjával kaptam**. Eredményeim alapján megállapítható, hogy mind a négy vizsgált halfaj esetében erős korreláció mutatkozik a felolvasztás utáni motilitás és a termékenyülési eredmények, illetve a felolvasztás utáni motilitás és a kelési eredmények között. Tehát ezeknél a fajoknál a mélyhűtött sperma felolvasztás utáni motilitása jól használható a termékenyülés eredményességének előrejelzésére.

Kísérleteim során **bebizonyosodott**, hogy az egyszerű fruktóz vagy glükóz alapú hígítók metanol védőanyaggal kombinálva sikeresen alkalmazhatók e négy pontyfélé spermamélyhűtéséhez.

Levonhattam azt a következtetést, hogy adott egy módszer, melynek használatával elősegíthetjük a veszélyeztetett és védett halfajok génbanki megőrzésének fejlődését.

3.3.11. Javaslatok

- Javaslom a pontyféléknél is bevált cukoralapú hígító (glükóz és/vagy fruktóz), valamint a metanol védőanyag alkalmazását hűtőmediumként, és ezen alapokra helyezve más pontyfélék (amur, vagy busa fajok) ivarsejtjeinek mélyhűtéséhez felhasználni.
- Javaslom a kidolgozott módszert génmegőrzési céllal alkalmazni, mivel kiforrt és jól reprodukálható technológia, és megbízhatóan produkálja az elvárt eredményeket.
- Javaslom a módszer génbanki alkalmazásának bevezetését.
- Javaslom a módszer alkalmazásakor elért eredményeket és kidolgozott metodikát a mélyhűtési technológia standardizálási követelményeinek kialakításánál figyelembe venni és felhasználni.

3.4. Kísérleti munka és eredmények bemutatása harcsa fajon

3.4.1. Bevezetés

A harcsa (25. sz. ábra) gazdaságilag jelentős ragadozó halfajunk. Indukált szaporítása már ismert, és magyar kutató-fejlesztő munka eredménye a keltetőházi módszer bevezetése a gyakorlatba, és elterjesztése szerte a világon (H.Tamás et al., 1982). Azonban a mesterséges (indukált) szaporítási módszer **kritikus lépése** az ivarok elkülönítése és a spermakinyerése, mely alapjaiban meghatározhatja a szaporítás eredményességét. Az ivarok elkülönítése tapasztalattal elsajátítható, az elsődleges ivari jellegű jelzések mellett másodlagos testparaméterek segítségével ez a probléma áthidalható. Viszont a harcsa tejeseek fejése nehézkes, gyakran nem megoldható, valamint a here eltávolításával sem biztos, hogy elegendő sperma áll rendelkezésre a szaporításnál.



25. sz. ábra: Harcsa (forrás: <http://tankonyvtar.hu>)

Így elmondható, hogy a **harcsa esetében gyakorlati előnyöket rejt magában a mélyhűtött sperma alkalmazása**, és ezért a mélyhűtési módszert az üzemi igényekhez igyekeztem társítani, és gyakorlatba könnyen adaptálható technológiát kívántam kidolgozni.

3.4.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása

A dolgozatban a harcsa hímivarsejt mélyhűtésből bemutatott eredmények 2003-2009 közötti időszakban végrehajtott kutatómunka eredményeinek az összefoglalása. Ezen kísérletek **több gyakorlati helyszínen** (6. sz. táblázat), valamint az **egyetem Halgazdálkodási Tanszékének** laboratóriumában hajtottam végre. A termékenyítési kísérleteket csak és kizárólag gyakorlati helyszíneken tudtam végezni, mivel tanszékünknek ezen tevékenység elvégzéséhez nincs meg a szükséges infrastruktúrája (7. sz. táblázat).

3.4.3. A hím egyedek tartása és kezelése

Halgazdálkodási Tanszék körülményeinek bemutatása: A harcsa hímek átlagosan 2-3 kg testtömegűek voltak és 2000 l-es műanyag kádakban tartottuk 13°C-on 0,1 l/mp vízátfolyás és 5-6 mg/l oxigénkoncentráció mellett. A halak

spermiációját 1 egység/testtömeg kg Ovopel szintetikus GnRH készítménnyel indukáltam. 20 órával az oltás után a hasüreg felnyitását követően a kioperált herét lemértem. A spermát steril mullpólyán keresztül száraz petricsészébe préseltem.

Gyakorlati helyszínek bemutatása: a terepi munkák elvégzése során alkalmazkodtam az adott vállalkozás által biztosított körülményekhez. Így egységes tartásmódról nem számolhatok be, a munkákat az adott vállalkozás termelés technológiájához és infrastrukturális feltételeihez igazítottam, melyet a 6. sz. táblázat mutat be.

6. sz. táblázat: A spermagyűjtési helyszínek főbb paraméterei

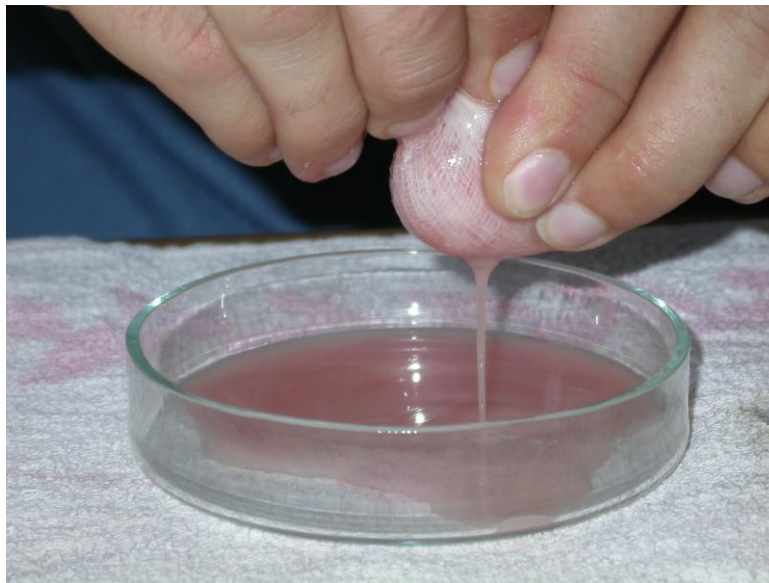
	Szarvas-Fish Kft.	Szegedfish Kft.	Aquakultúra Kft.	Fish-Coop Kft.
Egység jellege	intenzív telep	keltetőház	intenzív telep	keltetőház
Tartási körülmények	betonmedence	betonmedence	betonmedence	betonmedence
Rendszer jellemző	átfolyóvizes	átfolyóvizes	átfolyóvizes	átfolyóvizes
Vízforrás	termál kút	ártézi kút	termál kút	ártézi kút
Átlagos víz hőmérséklet	24 °C	21 °C	22 °C	21 °C
Oltás	4 mg/ttm kg hipofízis	4 mg/ttm kg hipofízis	4 mg/ttm kg hipofízis	4 mg/ttm kg hipofízis
Oltás módja	egy adagban	egy adagban	egy adagban	egy adagban

3.4.4. A hím ivartermék gyűjtésének, eltarthatóságának módszere

A felhasznált ivarterméket a teljes harcsák előlését követően, a hasüregből eltávolított herékből közvetlenül nyertem (vagyis nem fejéssel). A herét a hasüregből kiemeltem (26. sz. ábra), majd száraz mullpólyán felvágtam és a spermát a pólyán keresztül Petri-csészébe préseltem (27. sz. ábra). Ezen eljárás alatt a sperma vizelettel nem szennyeződhetett, a herében lévő vérerekből származó minimális vér pedig megfigyeléseim szerint nem befolyásolta a sperma minőségét.



26. sz. ábra: A kioperált harcsa here (fotó: Horváth Á., 2007)



27. sz. ábra: A harcsasperma kipréselése a kioperált heréből (fotó: Horváth Á., 2007).

A sperma kipréselése után meghatároztam az **ivartermék motilitását** fénymikroszkóp alatt, 200-szoros nagyításon. Tárgylemezen összekevertem 19 μ l vizet 1 μ l spermával és sötét látóterben becsültem meg a motilitás százalékos értékét.

Hígítóként 3 eltérő összetételű oldatot vizsgáltam:

- 6%-os fruktóz hígító: az oldat pH-át 1 M NaHCO_3 -al állítottuk be 7,73-ra.
- 6%-os glükóz hígító: az oldat pH-át 1 M NaHCO_3 -al állítottuk be 7,73-ra.
- Magyary et al. (1996a) féle ponty hígító (100 ml): 350 mg NaCl, 1000 mg KCl, 22 mg CaCl_2 , 8 mg MgCl_2 , 20 mg NaHCO_3 .

A mintákat 4 °C-on hűtve tároltam. A friss sperma vizsgálatától számított 1, 2, 3, 4 és 5 óra elteltével, ill. napi rendszerességgel, azonos időben motilitást néztem, mindaddig, amíg a spermiumok mozgása teljesen meg nem szűnt.

3.4.5. A mélyhűtés módszertana

A mélyhűtést az előzőekben leírt folyamat során nyert friss spermával végeztem. A **mélyhűtéshez 6 %-os fruktóz hígítót, védőanyagként 5% és 10 %-os végsőkoncentrációjú metanolt** teszteltem. A **spermát 1:1 arányban kevertem** össze a hűtőmédiummal. Az így kapott hígított spermából 4 ml-t pipettáztam egy **5 ml-es műszalmába**. Az 5 ml-es műszalmába, így 2 ml sperma, 1800 μ l fruktóz és 200 μ l metanol (5% védőanyag esetén), illetve 2 ml sperma, 1600 μ l fruktóz és 400 μ l metanol (10% védőanyag esetén) került. A felhígított spermát a hígítás után azonnal, **equilibrációs idő nélkül** szívtam fel a műszalmákba. A hűtést egy folyékony nitrogénnel megtöltött **polisztirol dobozban** végeztem. A nitrogén felszínére egy 3 cm magas polisztirol keretet helyeztem, majd erre fektettem a műszalmákat (28. sz. ábra). A hűtés ideje 5 perc volt. A hűtés után a szalmákat folyékony nitrogénbe helyeztem és felhasználásig ott tároltam.



28. sz. ábra: Harcsasperma mélyhűtése cseppfolyós nitrogén gőzében, 5 ml-es műszalmákban
(fotó: Bokor Z., 2007)

A műszalmákat 40 °C-os vízfürdőben olvasztottam fel 30 másodpercig. A felolvasztást követően a műszalmák lezárt végét felvágtam és a szalmák tartalmát kémcsőbe vagy közvetlenül a termékenyítendő ikratételre öntöttem. A **felolvasztott sperma motilitását** a fent leírtak szerint vizsgáltam.

3.4.6. A hűtési idő, hűtési sebesség és az sperma-ikra arány mélyhűtést befolyásoló hatásainak vizsgálata

A mélyhűtési módszer tökéletesítéséhez **vizsgáltam** a minták hűtési idejének hatását a felolvasztott sperma motilitására és termékenyítő képességére. Ez tulajdonképpen azt jelenti, hogy a hűtőmediummal és a spermával töltött műszalma mennyi időt tölt el a folyékony nitrogén gőzében, mielőtt a folyékony nitrogénbe kerül. A **minták hűtési idejét 3, 5, illetve 7 percben határoztam** meg. A hűtési idő leteltével a szalmákat a cseppfolyós nitrogénbe helyeztem.

A vizsgálataim folyamán meghatároztam a **hűtési sebességet** is. Egy műszalmát megtöltöttem a mélyhűtés során alkalmazott hűtőmediummal. A műszalmába egy Digi-Sense DualLogR digitális hőmérő (Eutech Instruments, Szingapúr) K típusú szenzorját helyeztem és a szalmát egy 3 cm magas polisztirol keretre raktam, amit a cseppfolyós nitrogén felszínére tettem. A hőmérő 1 másodperces intervallumokkal feljegyezte a hőmérsékleti értékeket. A hűtési értékeket 6 percen keresztül rögzítettem, mivel a hőmérő memóriájának tárolókapacitása ennyi adat rögzítését tette lehetővé.

A mélyhűtés alkalmazhatóságát az is befolyásolhatja, hogy milyen **ikra:sperma** arányt alkalmaznak a felhasználás során. Ezt a kérdéskört az alábbi **két kísérletsorozattal** vizsgáltam meg:

1. Az ikrát **40, 80 és 120 g-os adagokra osztottam szét** és azt termékenyítettem meg egy műszalmányi mélyhűtött spermával. Felolvasztás után a műszalmák tartalmát az ikradagokra ürítettem, és félfiziológiás sóoldattal (0,325% NaCl) aktiváltam az ivartermékeket. Ezt követően néhány perc múlva a sóoldatot lecseréltem sós-karbamidos termékenyítőoldatra és néhány perces kevergetés után az ikra ragadósság-elvételét 0,5 g/l-es

tanninoldatban fejeztem be. A termékenyített ikrát 7 l-es Zuger-üvegekben inkubáltam. Keléskor meghatároztam a kelési arányt.

2. Az ikratételeket **két 150 g-os adagra osztottam szét**, az egyik ikratételt egy, a másikat két műszalmányi felolvasztott spermával termékenyítettem meg. Mindkét tétel esetében a hűtési idő 7 perc volt. Az ikra ragadósságát nem szüntettem meg, hanem hagytam a keltetőedények falára tapadni. A termékenyítést követő 12 órával az üvegre felragadt ikrát finoman lekapartam, míg a csomóban álló részeket szétkevertem egy vászonnal bevont végű, vékony műanyag csővel. Keléskor meghatároztam a kelő lárvák arányát és a torz fejlődésű lárvák arányát is.

3.4.7. A termékenyítési kísérletek bemutatása és a módszer alkalmazhatóságának vizsgálata keltetőházi (üzemi) körülmények között

A termékenyítési kísérleteket kizárólag gyakorlati helyszíneken végeztem el (7. sz. táblázat). Az ikramennyiséget rutin szaporítási eljárás során nyertem ki az anyahalaktól.

A kísérletek során elvégeztem a 3.4.5. pontban leírt sperma:ikra arány optimalizálási vizsgálatokat, a megtermékenyített ikrákat 7 l-es Zuger-üvegekben inkubáltam, majd a kelést követően meghatároztam a kelési arányt.

7. sz. táblázat: A termékenyítési vizsgálati helyszínek főbb paraméterei

	Aranykárász Bt.	Aquakultúra Kft.	Attalai Hal Kft.	Tehag Kft.	Szegedfish Kft.
Egy szalmával termékenyített ikra mennyisége	200-350 g	200 g	200 g	200 g	150 g
Termékenyítő oldat	0,352 % NaCl	0,352 % NaCl	keltetőházi víz	0,352 % NaCl	keltetőházi víz
Duzzasztó oldat	0,4% NaCl, 0,3% karbamid	0,4% NaCl, 0,3% karbamid	0,352 % NaCl	0,352 % NaCl	0,352 % NaCl
Duzzasztás ideje	5-6 perc	5-6 perc	5 perc	45 perc	5 perc
Végső ragadósság elvételeének módja	0,05% tannin	0,05% tannin	nem volt	0,05% tannin	0,05% tannin

Az alkalmazhatósági kísérletek során csatlakozva a gazdaság rutinszerű technológiájához végeztem el a termékenyítési vizsgálatokat. Cél volt, hogy **nagy mennyiségben mélyhűtött spermával (5 ml-es műszalma) üzemi mennyiségű ikratételeket (150-350 g) termékenyítsek**, analízálva a módszer megbízhatóságát és ismételhetőségét. 1 adag üzemi mennyiségű ikratételhez egy műszalmát használtam a termékenyítéshez (29. sz. ábra). A kísérletek során a mélyhűtött sperma alkalmazhatóságának legfontosabb paraméterét, a kelő lárvák százalékos arányát határoztam meg.



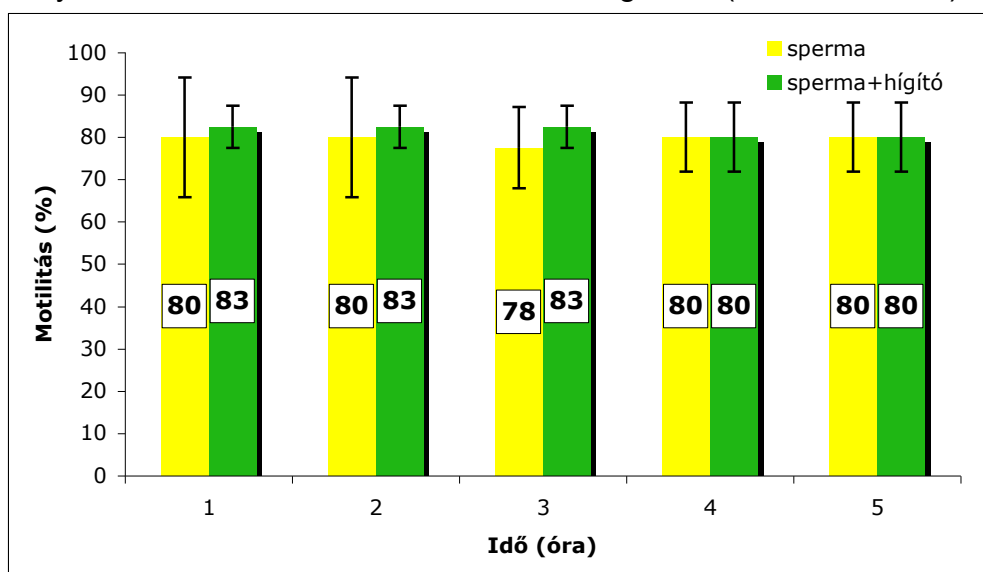
29. sz. ábra: Termékenyítés mélyhűtött harcsaspermával üzemi körülmények között – a műszalma felvágása a sperma kinyeréséhez (fotó: Bokor Z., 2007)

3.4.8. Alkalmazott statisztikai módszerek

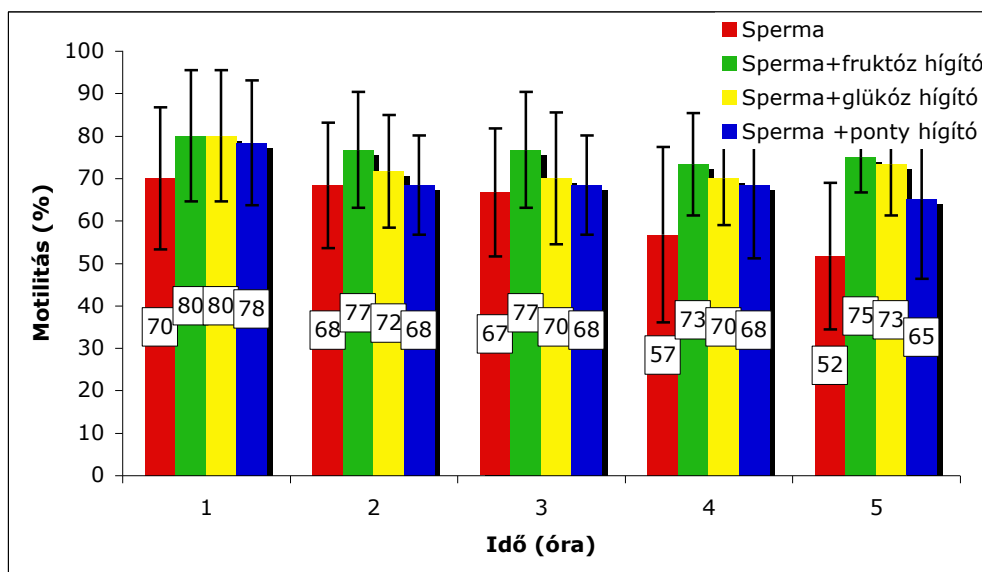
A hűtési idő és az ikramennyiség kelési arányra kifejtett hatását két szempontos varianciaanalízis segítségével vizsgáltam ($P < 0,05$). A termékenyítési kísérletekben a mélyhűtött és kontroll spermával kapott kelési eredményeket szintén kétmintás t-próbával elemeztem. Ezeket a statisztikai próbákat GraphPad Prism 4.0 for Windows program segítségével végeztem el.

3.4.9. Eredmények

A **sperma eltarthatósági vizsgálat** során egyik csoport esetében sem volt szignifikáns különbség a hígított és hígítatlan minták motilitása között, amiket a friss sperma kinyerésétől 5 órán keresztül óránként vizsgáltam (30-31. sz. ábra).

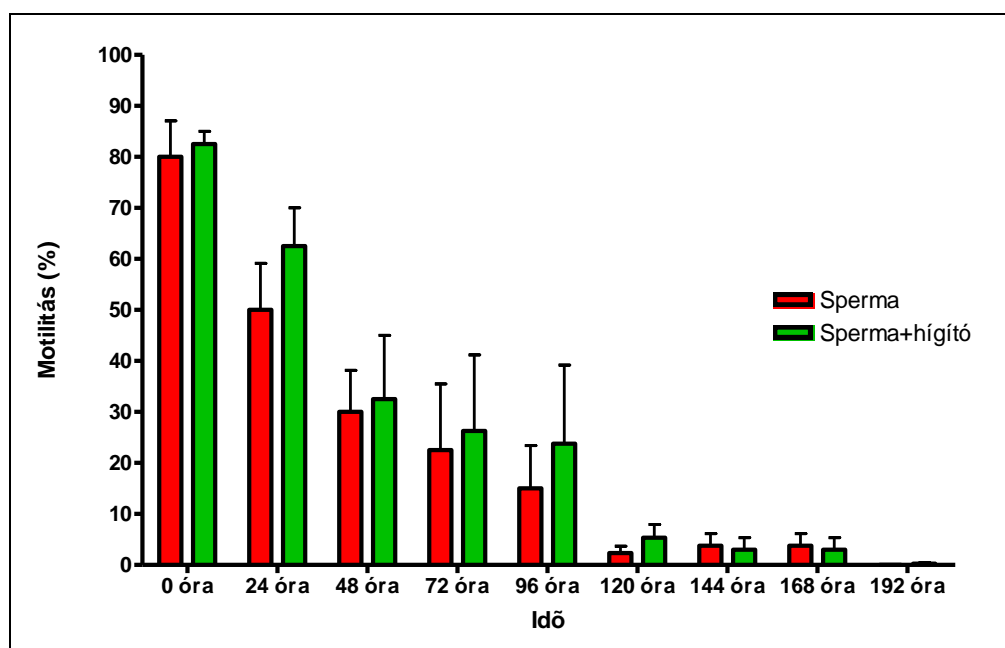


30. sz. ábra: Hígítatlan és fruktóz hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő első 5 órában (n=14)



31. sz. ábra: Hígítatlan és különböző hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő első 5 órában (n=16)

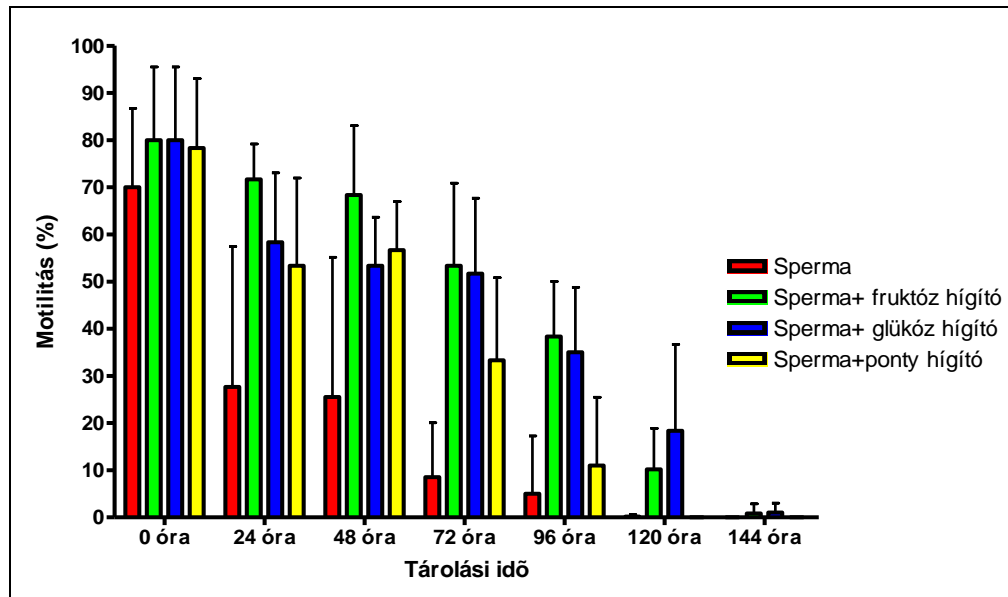
A két csoport spermájának motilitását 24 órás periódusonként is megvizsgáltam az idő, illetve a hígító függvényében. Az első kísérlet során (32. sz. ábra) **az idő változása befolyásolta a sperma motilitást**, ami folyamatosan csökkent, majd megszűnt, míg a hígított és a hígítatlan sperma között nem volt szignifikáns különbség.



32. sz. ábra: Hígítatlan és fruktóz hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő napokban (n=14)

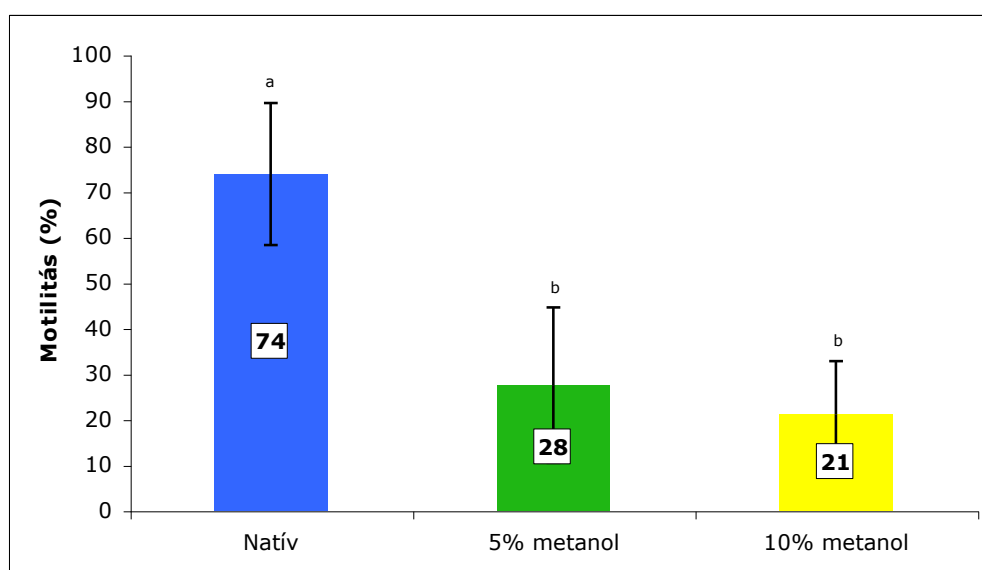
A második kísérlet során (33. sz. ábra) mind az idő, mind **a hígító befolyásolta a sperma motilitását**. Ebben az esetben is csökkent a motilitás az idő múlásával, míg a hígító tovább és magasabb %-on tartotta a sperma motilitását, szemben a hígítatlan spermával. A hígítatlan sperma és a hígított sperma motilitása között a 24-dik, a 42-dik, a 72-dik és a 96-dik órában szignifikáns különbséget találtam,

amennyiben a hígító fruktóz ($P < 0.001$ mindegyik időpontban), illetve glükóz ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.01$) volt. Abban az esetben, ha pontyhígítót használtam, akkor a 24-dik ($P < 0.05$), a 48-dik ($P < 0.01$) és 72-dik ($P < 0.05$) órában találtam szignifikáns különbséget a hígított és hígítatlan sperma motilitása között. A fruktóz és glükóz, illetve a pontyhígító között is találtam szignifikáns különbséget a 96-dik órában ($P < 0.01$, $P < 0.05$).



33. sz. ábra: A hígítatlan és a különböző hígítóval hígított harcsa sperma motilitása a kinyerést követő napokban (n=16)

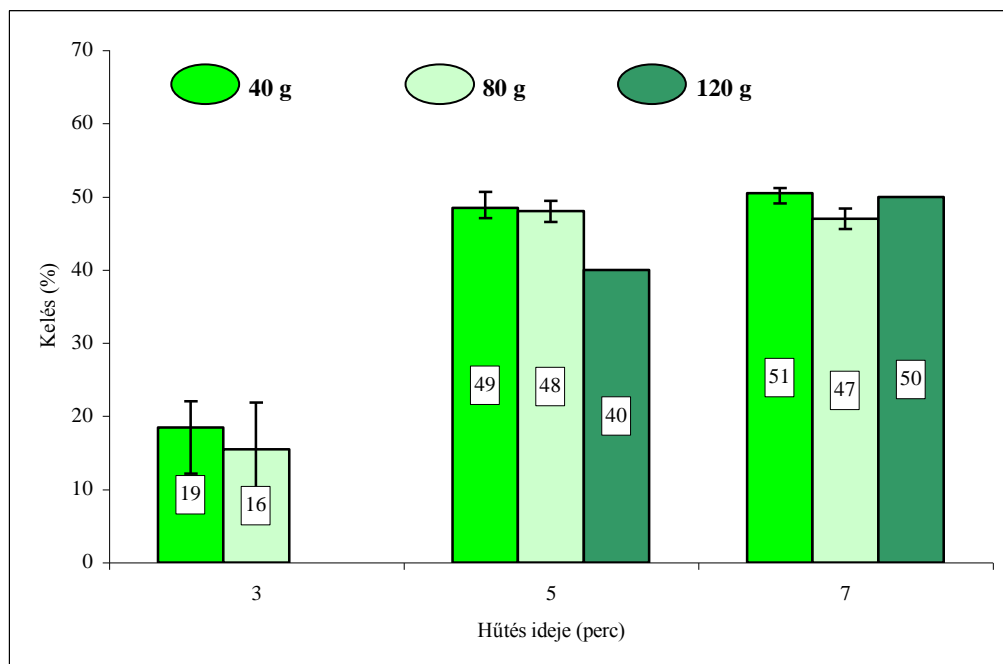
Statisztikailag **szignifikáns különbséget találtam a friss és a mélyhűtött sperma minták között védőanyagtól függetlenül**. A felolvasztás után a spermiumok motilitása csökkent, azonban minden esetben maradt életképes spermium (34. sz. ábra). A különböző koncentrációjú védőanyagok között nem találtam szignifikáns különbséget.



34. sz. ábra: A friss és különböző védőanyaggal kezelt, felolvasztott sperma motilitása (n=13)

A hűtési időre és az ikra-sperma arányra vonatkozó kísérletek eredményeinél a mélyhűtött sperma kiindulási motilitása 90% volt, míg a felolvasztás utáni motilitás értéke egyöntetűen 80% volt.

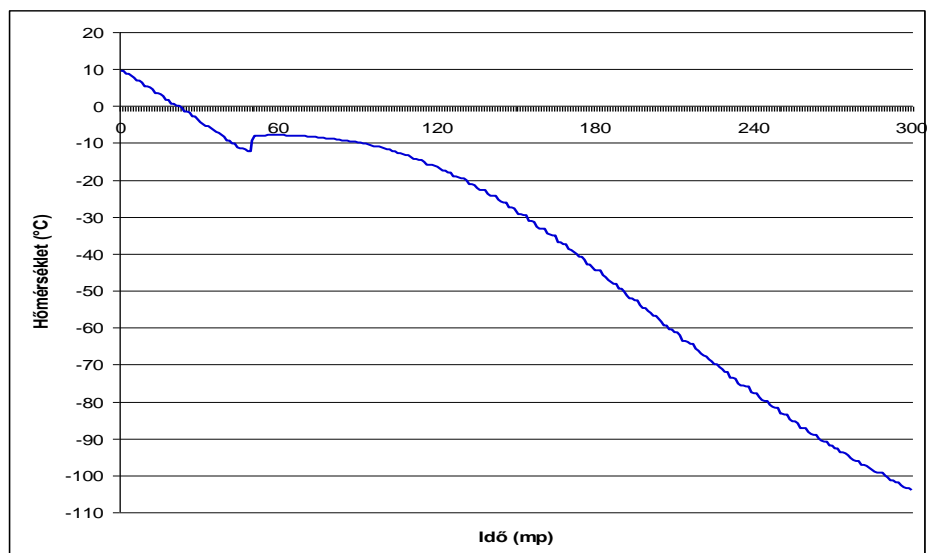
A termékenyítési kísérletek során a **legmagasabb kelési arányt** ($51\pm 1\%$) 7 perces hűtési időnél és 40 g ikra termékenyítésekor kaptam, azonban meg kell jegyezni, hogy az 5 perces és 7 perces hűtési idő esetében mindhárom termékenyített ikratétel esetében igen kiegyenlített kelési eredményeket kaptam ($40\pm 0\%$ és $51\pm 1\%$ között). A statisztikai értékelést követően megállapítottam, hogy a termékenyített ikra mennyiségének nem, de a hűtési időnek volt szignifikáns hatása ($P < 0.0001$) a kapott eredményekre, tekintettel arra, hogy a 3 perces hűtési idő mellett gyengébb kelési százalékot kaptam (35. sz. ábra).



35. sz. ábra: A hűtési időnek és az ikra mennyiségének hatása a kelési eredményekre (n=12, kontroll: 57 ± 2)

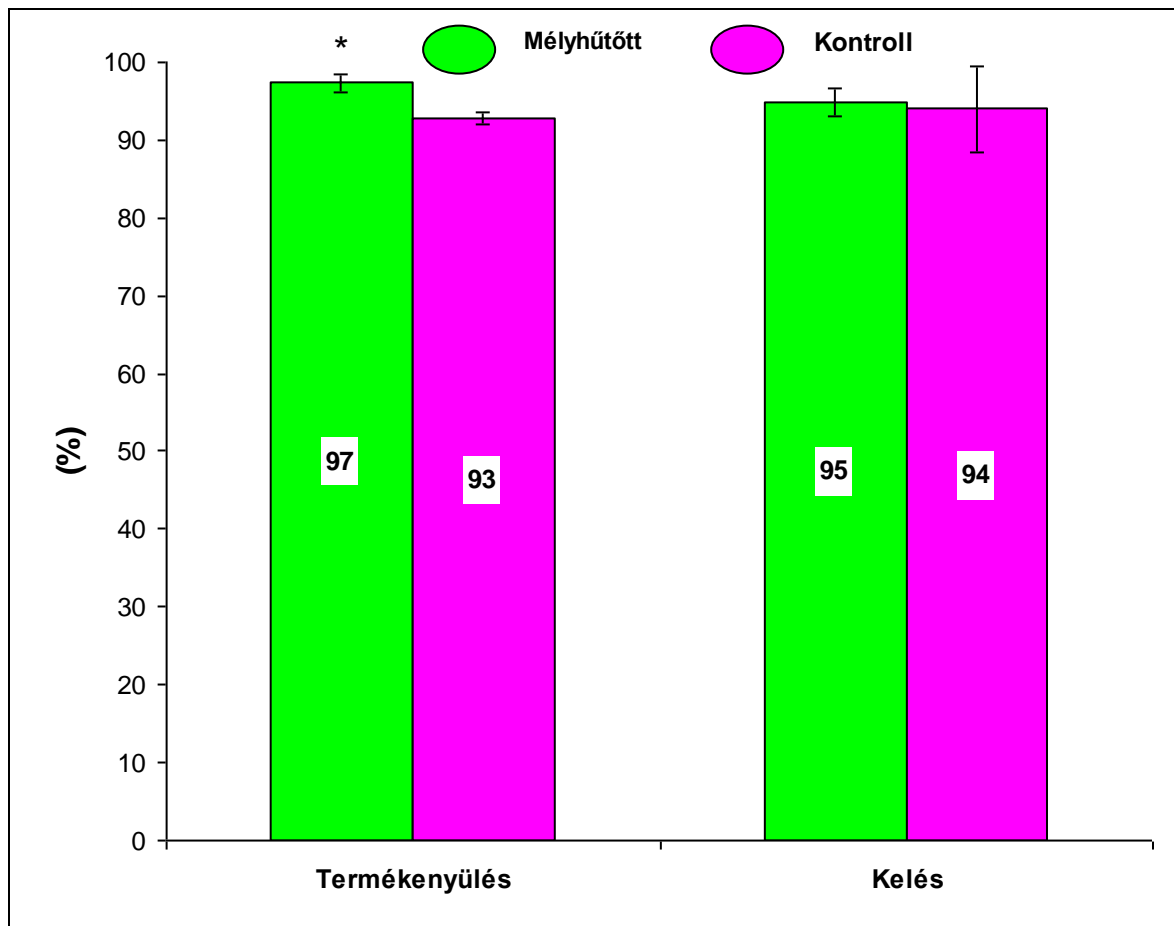
A további vizsgálataim során az egy műszalma mélyhűtött spermával termékenyített ikratétel kelési eredménye 94%, a két műszalmával termékenyítetté 77% lett, míg a két kezelés kontroll csoportjában 89%, illetve 81% kelést regisztráltam. Érdemes megjegyezni, hogy az egy műszalmányi felolvasztott spermával termékenyített csoportban a torz fejlődésű lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest mindössze 2,4% volt (1,8% a kontrollban), míg a két műszalmányi spermával termékenyített csoportban 11,2% (kontroll: 7,3%).

Az 5 ml-es műszalmákkal kapott **hűtési sebesség** -23 °C/perc körül alakult (36. sz. ábra). Megfigyeltem, hogy a műszalma hőmérséklete 3 perces hűtés után még csak -45 °C volt.



36. sz. ábra: A hőmérséklet változása az 5 ml-es műszalma hűtése során

A keltetőházi/üzemi körülmények közötti vizsgálat sorozatban megfigyeltem, hogy a különböző keltetési kísérletek eredményei elsősorban a **különböző gazdaságoktól függték**, pontosabban az alkalmazott szaporítási eljárástól és az ikra minőségétől, sőt nagyon erősen függött a realizált eredmény az egyes egyedek felkészültségétől is. Az attalai kísérletben a mélyhűtött spermával végzett termékenyítés során a termékenyülés 97 ± 1 % volt, míg a kontroll termékenyülés 93 ± 1 % (37. sz. ábra). A két eredmény között statisztikailag szignifikáns különbséget mutattam ki ($P=0,0084$). A lárvák kelési aránya ugyanebben a kísérletben 95 ± 2 % volt a mélyhűtött spermával termékenyített ikraadagok esetében, míg a kontroll csoportban 94 ± 6 %. A kelési eredmények között már nem találtam statisztikailag igazolható különbséget.

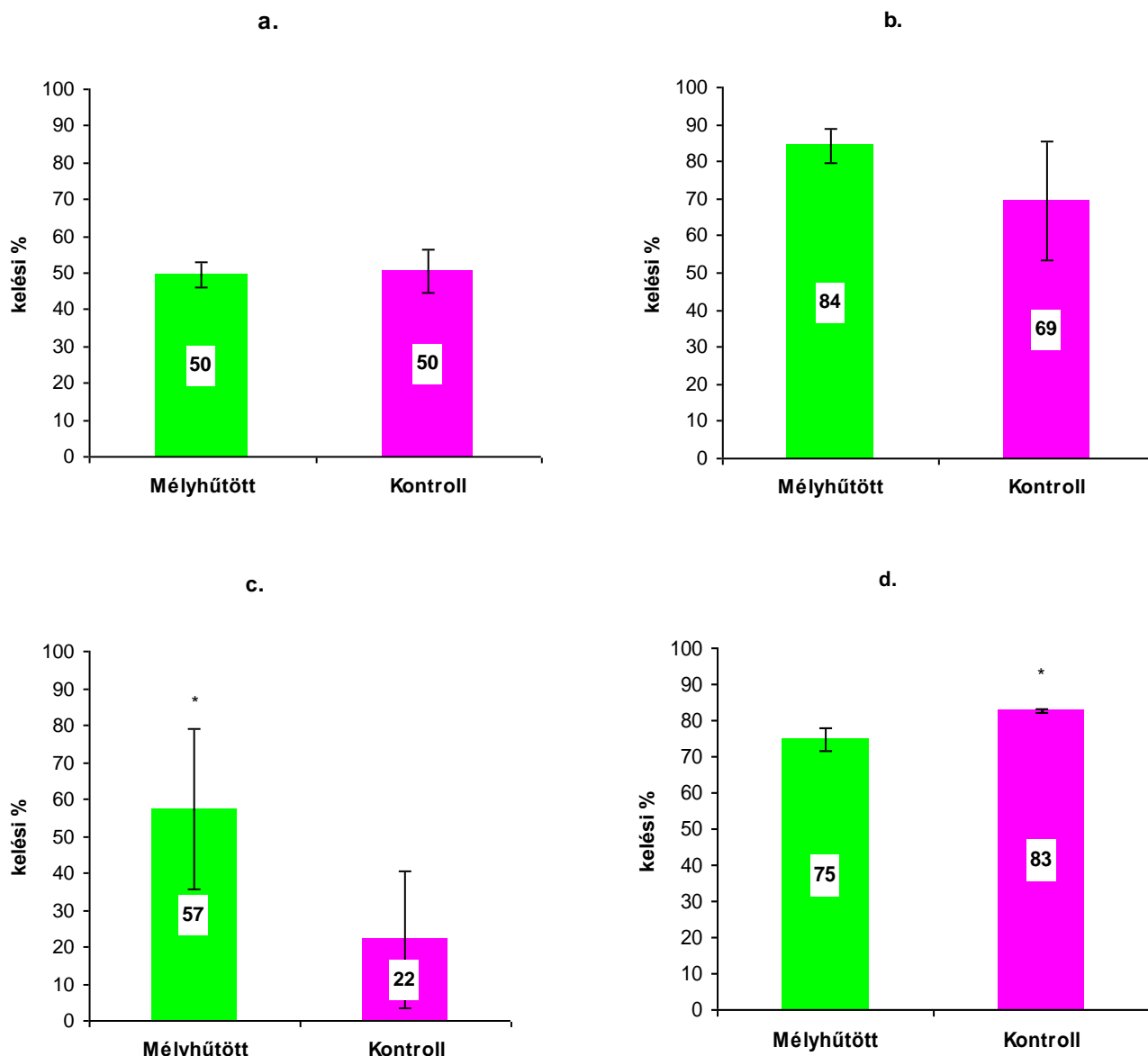


37. sz. ábra: Mélyhűtött harcsaspermával termékenyített ikratételek termékenyülési és kelési eredményei az attalai keltetőházban (n=13)

A százhalombattai kísérletekben a mélyhűtött spermával végzett termékenyítésből származó **lárvák kelési aránya** $50 \pm 3 \%$ volt, míg ugyanebben a kísérletben a kontroll kelés $50 \pm 6 \%$ volt. Az eredmények között statisztikailag szignifikáns különbséget nem mutattam ki. A körömi kísérletben a mélyhűtött spermából származó lárvák kelése $84 \pm 5 \%$ volt, míg a kontroll csoporté $69 \pm 16 \%$. Az eredmények között itt sem találtunk statisztikailag igazolható különbséget.

Az Aranykárász Bt. ördögősi keltetőjében végzett kísérletben a mélyhűtött spermából származó lárvák kelése $57 \pm 22 \%$ körül alakult, míg a kontroll csoporté $22 \pm 18 \%$ volt. Ebben az esetben statisztikailag szignifikáns különbséget ($P=0,05$) találtam a mélyhűtött és a kontroll csoport között.

A szegedi kísérletben a lárvák kelési aránya a mélyhűtött spermából származó csoportban $75 \pm 3 \%$ volt, míg a kontrollban $83 \pm 1 \%$ és itt is statisztikailag szignifikáns különbséget ($P=0,0249$) tudtam kimutatni a kelési eredmények között (38. sz. ábra).



38. sz. ábra: A százhalombattai (a.), körömi (b.), ördögösi (c.) és szegedi (d.) gazdaságokban kapott kelési eredmények mélyhűtött harcsaspermával végzett termékenyítés után (n=9)

3.4.10. Következtetések

A **sperma rövid távú tárolásának lehetősége** már régóta foglalkoztatja a kutatókat. A rövid távú tárolás lehetővé teszi a sperma használatát egy későbbi időpontban, amennyiben az nem került teljes mértékben felhasználásra a szaporításkor, vagy a szaporítás valamilyen okból (pl. a tejes és ikrás egyedek elkülönítésének nehézségei miatt) elmarad. Vizsgálataim kimutatták, hogy a sperma hígítása különböző hígítókkal javíthatja a spermiumok túlélését, **különösen a cukor alapú (glükóz és fruktóz) hígítók esetén**. Megállapítottam, hogy a spermiumok egy része az adott tárolási körülmények között több mint egy hétig megőrzi motilitását. Természetesen a tárolás körülményein még lehetne javítani, pl. nagyobb mennyiségű sperma tárolásával, nagyobb felületen történő tárolással, ami lehetővé teszi a levegővel történő érintkezést. A sperma életképességére jó hatással van az oxigénkezelés (Magyary et al., 1996b), valamint a különböző antibiotikumok

használata (Jenkins, 2000). A sperma hígítójához adagolt antibiotikumok jelentősen javították többek között a 4 °C-on tárolt csatornaharcsa spermiumok túlélését (Christensen és Tiersch, 1996), habár a vizsgálataim során nem észleltem a spermában baktériumok jelenlétét.

Vizsgálataim során **megállapítottam**, hogy az egyszerűbb összetételű cukor alapú hígítókban tárolt sperma minősége nem marad el a bonyolultabb összetételű, a szeminális folyadék komponenseinek vizsgálata alapján összeállított hígítótól (adott esetben a pontyhígítótól). Ez megegyezik a spermamélyhűtési szakirodalom általános javaslatával, ami az egyszerűbb hígítók használatát ajánlja a legtöbb esetben (Ciereszko et al., 2000). Például Erdahl-féle (1986) 6. számú hígító 9 összetevőt tartalmazott, aminek elkészítése idő- és költségigényes, és nem feltétlenül váltja be a hozzá fűzött reményeket. A csukasperma mélyhűtések tapasztalták, hogy az egyszerű 0,6 M glükóz alapú hígító jobb eredményeket adott (Glogowski et al., 1997), mint a korábban használt bonyolultabb hígító (Babiak et al., 1995). Hasonló megállapításra jutottak magyar kutatók pontyon is (Horváth et al., 2003).

A harcsasperma mélyhűtésére tett előkísérleteim során megállapítottam, hogy habár a felolvasztott sperma minősége (motilitása) gyengébb a friss spermánál, így is tartalmazott elegendő mennyiségű mozgásra, így valószínűleg termékenyítésre is alkalmas sejtet. A harcsafajok esetén a sperma felolvasztás utáni motilitása általában gyenge, 20-40% körüli (Tiersch et al., 1994, Horváth és Urbányi, 2000), ám ez a sperma tökéletesen alkalmas a termékenyítésre.

Mélyhűtési kísérleteim során **különösen fontosnak tartottuk a nagyméretű, 4-5 ml térfogatú műszalmák használatát**. Ez, ugyanis a halsperma mélyhűtésének egyik kulcsfontosságú problémája. A halaktól egyszerre nagy mennyiségű ivartermék (ikra és sperma) nyerhető ki, és a keltetőházi gyakorlatba beépült a nagy mennyiségű ivartermék egyidejű kezelése. Ezzel szemben a spermamélyhűtés módszereit elsősorban emlőszállatokra, azon belül is a szarvasmarhára dolgozták ki, ahol a 0,25, illetve 0,5 ml űrtartalmú műszalmák használata vált be, és tökéletesen megfelel a gyakorlatnak. Az ilyen kisméretű műszalmák használata a halgazdálkodás igényeit nem elégíti ki, hogy nagymértékben korlátozza az egyszerre lehűthető és felolvasztható sperma mennyiségét (különösen, ha figyelembe vesszük a sperma hígítását is a mélyhűtés előtt), és nehézkessé teszi a gyakorlatnak megfelelő nagymennyiségű ivartermék használatát.

A halsperma-mélyhűtés kutatói között jelenleg **két módszertani „iskola”** van kialakulóban. Az **egyik iskola** (Caffey és Tiersch, 2000) szerint a mélyhűtés módszertanát már kidolgozták, és széles körben alkalmazzák, ezért a halspermát mélyhűtő egységeknek a szarvasmarhára kidolgozott módszertant kell átvenniük, és a halgazdaságoknak kell rugalmasabbá válniuk a nagymennyiségű ivartermék kezelését illetően. A bikasperma mélyhűtésére szakosodott központokban (mesterséges termékenyítő állomásokon, mélyhűtött génbankokban) a mélyhűtés nagymértékben automatizált (a műszalmákat számítógéppel feliratozzák, gépesített a feltöltésük, lezárásuk és hűtésük), és megoldottak a kórokozókkal és szennyezésekkel szembeni védelem, valamint a minőségbiztosítás kérdései. Ezzel szemben a kutatók jóval nagyobb részét tömörítő **másik iskola** szerint a mélyhűtés iparának kell alkalmazkodni a halgazdaságok eltérő igényeihez, és kutatói háttérnek kell kidolgozni módszereket a nagymennyiségű sperma mélyhűtésére. Lahnsteiner et al., (1997) sikerrel alkalmazta pisztrángfélék spermáján az 1,2 ml űrtartalmú szalmákat, míg Wheeler és Thorgaard (1991) jó eredményeket ért el a 4,5 ml térfogatú műszalmák használatával. Vizsgálataim során azt tapasztaltam, hogy az 5

ml-es műszalmák használatával a spermiumok egy jelentős része megőrzi motilitását. Ezen előkísérletek során kapott eredményem alapozta meg az üzemi szintű kutatásaimat, melyre alapozva dolgoztam ki a gyakorlat számára a metodikát.

A **gyakorlat orientált kísérletekben** 6 %-os fruktóz és 10 %-os végsőkoncentrációjú metanolt használtam. Az üzemi felhasználás egyik fontos követelménye, hogy nagy mennyiségű spermát lehessen hűteni és ezzel a keltetőházban szokásos nagy mennyiségű ikrát lehessen termékenyíteni. Nagy, azaz **4-5 ml-es műszalma** használatára találhatunk irodalmi forrásokat (Cabrita et al., 2001; Brown és Mims, 1999) más halfajok esetében, azonban az eredmények ellentmondásosak. A műszalma méretéből fakadóan eltérő hűtési és felolvasztási körülmények uralkodnak a műszalmában, szemben a kutatások többségében használatos 0,5 ml-es műszalmákkal. **Kísérleteimben 5 ml-es műszalmát használtam**, melybe 4 ml hígított spermát töltöttem. A felolvasztást követően egyik esetben sem tapasztaltam a sperma minőségében jelentős romlást. Ennek egyik oka, hogy meghatároztam azt a hűtési időt, mely a legjobb termékenyülési arányt eredményezte. A **hűtési eljárás során** 5 ml-es műszalmák alkalmazása esetében a 7 perces hűtési idő bizonyult a legeredményesebbnek, ellentétben a 3 perces hűtéssel.

A kapott eredmény tükrében **megvizsgáltam a hőmérsékleti viszonyokat hűtés közben** az 5 ml-es műszalmában és 3 perces hűtésnél a műszalmák hőmérséklete csak -45 °C-ig csökkent, ami feltételezhetően még nem elégséges a sérülésmentes fagyáshoz. Ez az eredmény összhangban van Horváth et al. (2007) vizsgálataival, akik azt a megfigyelést tették ponty esetében, hogy a 4 és 5 ml-es műszalmákban 3 perces folyékony nitrogén gőzben történő hűtés esetén a minta csak -30 és -40°C-ig hűl le. Egy másik vizsgálat szintén a hosszú idejű, 10 perces hűtésről számol be (Cabrita et al., 2001).

Kísérleteim során kiderült, hogy az egy műszalmában található 2 ml sperma elegendő spermiumot tartalmazott 120 g ikra termékenyítésére is, így munkám során tovább növelhettem az egy műszalmával termékenyíthető ikra mennyiségét.

Nagy mennyiségű sperma sikeres hűtését és felolvasztását követően a **következő fontos lépés az üzemi technológia kialakításánál**, hogy a felolvasztott spermával nagy mennyiségű ikrát tudjunk biztonságosan termékenyíteni. Lubzens et al. (1997) vizsgálta pontyon a különbséget 1 ml és 100 ml ikratétel termékenyítésénél, ahol az 1 ml-es adagok jobb eredményeket adtak. A szerző ezt a nem megfelelő sperma-ikra arányra vezette vissza. Kísérleteimben 150-350 g közötti ikratételeket termékenyítettem 1 műszalma tartalmával. Ennél pedig biztonsággal nem keltethető nagyobb mennyiség egy 7 l-es Zuger üvegben (Szabó, 2000). Gyakorlatilag minden esetben a kontrollal megegyező kelési eredményeket kaptam, mely bizonyítja, hogy nem értem el azt a sperma-ikra arányt, ami már kimutatható csökkenést okoz a termékenyülésben. A vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a kifejlesztet módszer nagy biztonsággal alkalmazható a keltetőházi harcsaszaporítás során.

3.4.11. Javaslatok

- Javaslom a gyakorlati felhasználók számára a harcsa sperma rövidtávú tárolását hűtött (pl. hűtőszekrény) körülmények között, mivel 96 óra időtartam alatt a 6%-os fruktóz és 6%-os glükóz hígító egyaránt megőrzi a sperma termékenyítőképességét.
- Javaslom a 6%-os fruktóz és 10%-os végkoncentrációjú metanol elegyét, mint hűtőmedium alkalmazni a harcsa spermamélyhűtéshez.
- Javaslom a hűtési metodikához a 3 cm-es polisztirol keret alkalmazását, 7 perc időtartamú hűtéssel.
- A módszer már javasolható az üzemi körülmények között történő használatra, mivel egy műszalmányi (4ml) mélyhűtött harcsasperma kiválóan alkalmas 150 g frissen fejt harcsaikra termékenyítésére a kelési eredmények gyengülése nélkül.
- Javaslom a kidolgozott és üzemi körülmények között is bevált mélyhűtési módszer génbanki felhasználását, elsősorban külföldi megőrzési tevékenységek elvégzésére.
- Javaslom a hűtőmedium, a hűtési módszer és a mélyhűtött spermával való termékenyítés alkalmazhatóságának további vizsgálatát a mélyhűtés standardizálásának fejlesztésében.

3.5. Kísérleti munka és eredmények bemutatása süllő fajon

3.5.1. Bevezetés

A süllő (39. sz. ábra) hazánk egyik hungarikum halfaja, ragadozó életmódot folytat, húsa kiváló, mint termék korlátlan hazai és uniós piacokkal rendelkezik.

A süllőt korábban igen érzékeny, a technológiát kevésbé tűrő halnak tartották, ezért is fejlesztették ki a fészekre ívatást, illetve a permetkamrás süllő ikra érlelési módszert. Az elmúlt években azonban, jelentős szerepet vállalva a munkában az Attala Hal Kft., a vélemények átalakultak. A süllő is, bizonyos bánásmód mellett jól beilleszthető a hagyományos keltetőházi technológiába, tűrőképessége többszöröse a korábban feltételezetteknek, jól fejhető, és kiváló terméket lehet produkálni (egynyaras és kétnyaras süllő állomány).



39. sz. ábra: Süllő (forrás: <http://tankonyvtar.hu>)

A fentiek alapján kijelenthető, hogy a **süllő szaporításnál is van létjogosultsága a spermamélyhűtésnek**. Ezt támasztja alá az a tény, hogy süllő eltérő ivarainak szaporítási szinkronizálása keltetőházban még nem működik olyan pontossággal, mint pl. a ponty esetében. Így a mélyhűtés segíti a munkacsúcsok alkalmával, a szaporítás alatti torlódások könnyű áthidalását, illetve segíti a szakembereket, hogy „csak” az egyik ivar, nevezetesen az ikrások ovulációjának időpontjára koncentráljanak, mivel a sperma fagyasztva már rendelkezésre áll.

3.5.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása

A dolgozatban bemutatott kísérletek eredményei 2005-2010. közötti időszakból származnak. Kísérleteimet az Attalai Hal Kft. attalái keltetőjében végeztem. A kísérleti süllőállományt a fogadó gazdaság saját állománya alkotta.

3.5.3. A halak tartása és kezelése

Az attalái gazdaságban **a kutatómunkát a keltetőházi süllőszaporítással párhuzamosan végeztem**. Az anyákat 4 mg/ttm kg hipofízissel oltottuk 72 órával a fejest megelőzően és betonmedencében vártam be az ovuláció és spermiáció beindulását.

Az ikrások kezelése során a tartómedencéből kíméletesen anyahálóval kifogtam és áthelyeztem a kiválasztott egyedet az altatóoldatba (10 csepp szegfűszegolaj 10 l vízben). Bódítást követően az ivarnyílás környékét szárazra töröltem az esetleges

szennyeződések elkerülése végett, majd a hasfal masszírozásával tiszta, száraz edénybe fejem az ikrát.

A hímeket szintén szegfűszeg olaj segítségével altattam, majd a spermát kézi fejéssel egy automata pipetta segítségével gyűjtöttem össze (40. sz. ábra), ügyelve arra, hogy vizelettel, illetve széklettel ne szennyeződjön az ivartermék.



40. sz. ábra: A sperma begyűjtése automata pipetta segítségével (fotó: Horváth Á., 2005)

3.5.4. A sperma vizsgálata

A friss sperma motilitását vízzel aktiválva becsültem meg. A motilitást tárgylemezen vizsgáltam 20-szoros hígításban, 200-szoros nagyítás mellett, Zeiss Laboval 4 mikroszkóp segítségével (Carl Zeiss, Jena, NDK). A sperma sűrűségét Bürker-kamrás módszerrel állapítottam meg 1000-szeres hígításban. A kamra egyes négyzeteiben megszámoltam a hímivarsejtek számát, majd ezt átlagoltam. A ml-enkénti sejtszámot (N) a következő képlet segítségével számoltam ki a Bürker-kamrában számolt sejtek átlagából (X):

$$N = X \times 25 \times 10 \times 1000 \times 1000$$

Magyarázat: a Bürker-kamra egy négyzetének területe $1/25 \text{ mm}^2$, magassága $1/10 \text{ mm}$, így kapjuk meg az $1 \text{ }\mu\text{l}$ -ben lévő sejtszámot, ezt szorozva 1000-rel kapjuk meg a ml-enkénti sejtszámot és az utolsó szám a hígítási arány.

3.5.5. A spermamélyhűtés menete

A használt oldatokat egységesen 500 ml-es kiserelésben készítettem el, és a pH-t 8-as értékre állítottam be.

- 350 mMol Glükóz, 30mMol Tris;
- 200 mMol KCl, 30 mMol Tris;
- 300 mMol Szacharóz, 30mMol Tris;
- Pontyhígító; 1,75g NaCl; 5g KCl; 0,1456g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,0853g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1g NaHCO_3

Védőanyagként metanolt, illetve dimetil-szulfoxidot (DMSO) használtam 10% végső koncentrációban. Minden a kísérletben szereplő vegyszert a Reanal Kft-től rendeltem (Budapest, Magyarország).

A hűtőmédiával (200 µl védőanyag, 1600 µl hígító) 1:9 arányban kevert spermát (200 µl) az előre egyedileg megjelölt, 0,5 ml-es műszalmákba, 3 perces egyensúlyozási idő után szívtam fel DMSO alkalmazásakor, míg a metanol esetében egyensúlyozást nem alkalmaztam. A hűtést egy folyékony nitrogénnel megtöltött polisztirol dobozban végeztem. A nitrogén felszínére egy 3 cm magas polisztirol keretet helyeztem, majd erre fektettem a műszalmákat. A hűtés ideje 3 perc volt. A hűtés után a szalmákat folyékony nitrogénbe helyeztem és felhasználásig ott tároltam. A felolvasztás 40 °C vízfürdőben történt 13 másodpercig. A felolvasztás után a sperma motilitását a friss spermánál leírt módon vizsgáltam.

3.5.6. Termékenyítés mélyhűtött spermával

Az ikrát 10 g-os (kb. 10.000 ikraszem) adagokra osztottam műanyag edényekbe. Minden adagot egy felolvasztott műszalmányi minta (0,5 ml) segítségével termékenyítettem. Az aktivációt követően 1 ml Woynárovich oldatot adtam az ikrához, amit 90 percig duzzasztottam állandó kevergetés mellett. A duzzasztást követően az ikrát 0,5 %-os tannin oldattal kezeltem, majd 7 l-es Zuger-üvegekbe helyeztem az ikrát kelésig (6 nap, 14 °C-on). Ezt követően megszámláltam a kikelt lárvákat és kiszámoltam a kelési százalékot.

3.5.7. Mélyhűtött süllő sperma alkalmazhatóságának vizsgálata keltetőházi (üzemi) körülmények között

A halak tartása és kezelése nagyrészt megegyezik a 3.5.2. pontban leírtakkal. Az előző kísérletek során nehéz volt elkerülni a sperma vizelettel történő keveredését, így ebben az esetben a fejést egy szilikon katéter (belső átmérő: 1 mm, külső átmérő: 1,5 mm) segítségével végeztem, melyet felhelyeztem az ondóvezetékbe (41. sz. ábra). A motilitás vizsgálatot az előzőekben leírtak alapján végeztem.



41. sz. ábra: Süllő sperma fejése szilikon katéter segítségével (fotó: Horváth Á., 2007)

A spermát 1:1 arányban hígítottam a következő összetételű hűtőmediummal: 350 mM glükóz, 30 mM Tris, pH 8.0 (ccHCl-el beállítva), 10 %-os végső koncentrációjú metanol. A hígított ivarterméket 0,5 ml-es szalmákba töltöttem, majd a hűtést folyékony nitrogén gőzében végeztem egy polisztirol dobozban. A hűtés egy, a folyékony nitrogén felszínétől 3 cm magasan úszó polisztirol kereten történt 3 percig, ezt követően a mintákat a folyékony nitrogénbe helyeztem. A spermát 1 hétig tároltam folyékony nitrogénnel töltött kaniszeres kannában (BIO 20, Statbourne Cryogenics, Washington Tyne & Wear, UK). A felolvasztást 40°C-os vízfürdőben 13 másodpercig végeztem. Ezt követően szintén megvizsgáltam a minták motilitását.

Az ikrásokat óránként ellenőriztem, hogy felkészültek-e a fejésre. Az altatás és fejés folyamata megegyezett az előző kísérletekben alkalmazott módszerekkel. A lefejt ikrát 13 ismétlésben 10 és 30 g-os adagokra osztottam. Egy adag ikrát 1 műszalma tartalmával termékenyítettem (42. sz. ábra). Kontrollként frissen fejt spermát használtam. Az ikrát Woynárovich oldatban 90 percig, állandó kevergetés mellett duzzasztottam. Ezt követően tannin (0,5 g/l) oldattal vettem el a ragadósságot (20 másodpercig, kétszer). Az egyes tételeket külön 7 l-es Zuger-üvegekbe öntöttem inkubáció céljából. A kelést követően a kelési arányt leszámoaltam.



42. sz. ábra: Süllőikra termékenyítése mélyhűtött spermával (fotó: Bokor Z., 2007)

3.5.8. Alkalmazott statisztikai módszerek

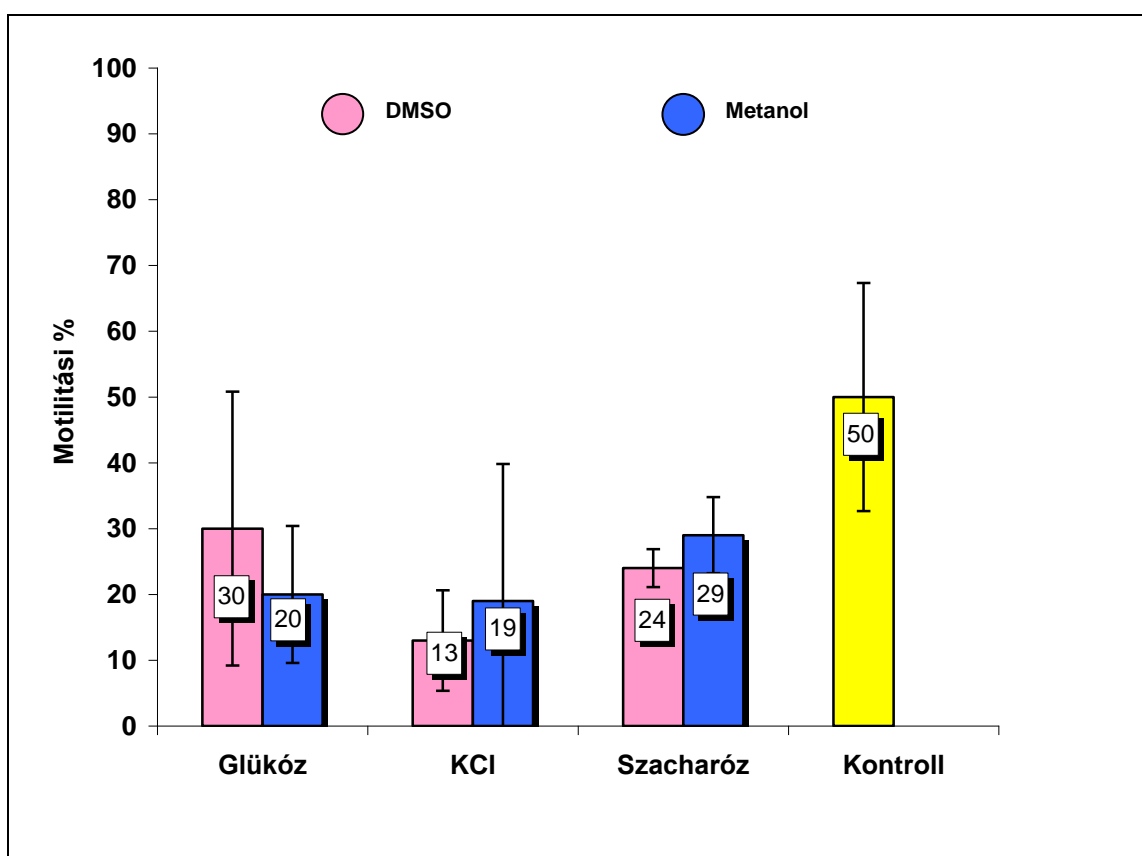
A vizsgálatok eredményeinek értékelését Graphpad Prism 4.0 for Windows programmal végeztem. A védőanyagok és hígítók a motilitásra és a termékenyülésre kifejtett hatását, illetve a hígítási arány és a védőanyagok kelési arányra kifejtett hatását kétszemponos varianciaanalízis segítségével vizsgáltam (ANOVA) (3.2.1-es fejezet).

Az üzemi szintű vizsgálatok során kapott eredményeket, azaz motilitás (felolvasztott és friss sperma) és kelési eredményeket (10 és 30 g-os ikratétel esetében) 2 mintás t-próba ($P \leq 0,05$) segítségével értékeltem.

3.5.9. Eredmények

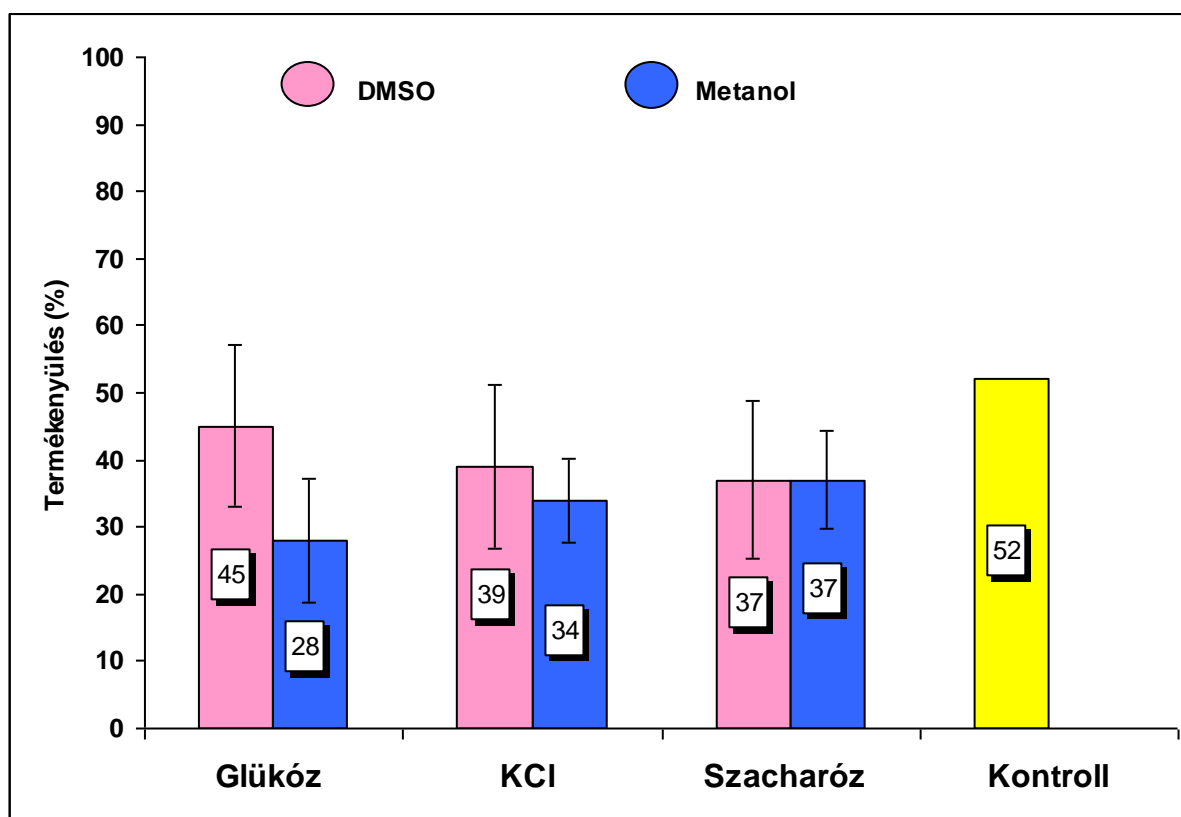
A kísérleteim kezdetén minden igyekezet ellenére sem tudtam elkerülni, hogy a **tejesek fejése közben a sperma ne keveredjen vizelettel**, így a frissen fejt süllő sperma motilitása $50 \pm 17\%$ volt. A mélyhűtött minták közül a glükóz hígító és DMSO védőanyag kombináció produkálta a **legmagasabb felolvasztás utáni motilitást** $28 \pm 21\%$ (43. sz. ábra), azonban statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam az egyes kezelések között.

A Bürker-kamrás számolással a süllő sperma átlagsűrűsége $0,85 \pm 0,19 \times 10^{10}$ (spermium/ml) értéket adott.



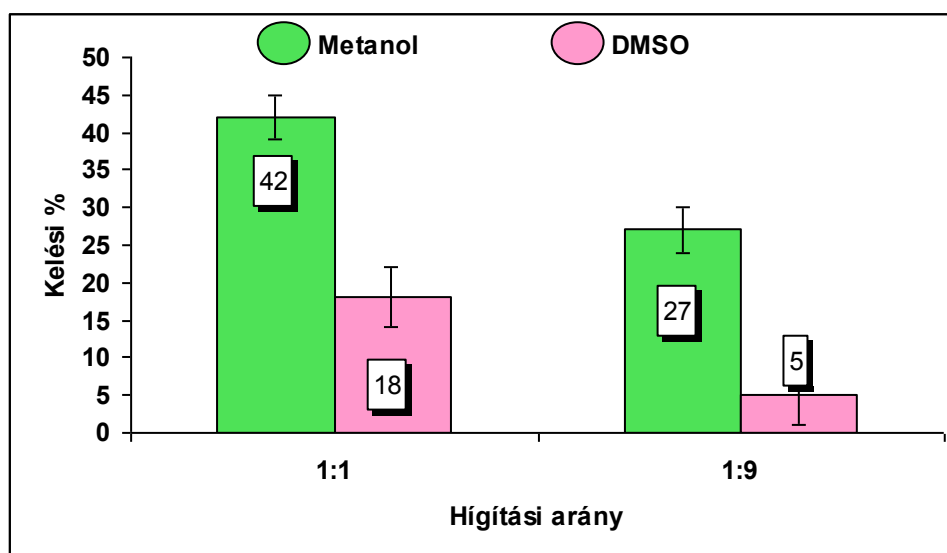
43. sz. ábra: A felolvasztott süllő sperma motilitása (n=15)

A termékenyítési kísérletekben a **legmagasabb termékenyülést** ($43 \pm 12\%$) a glükóz hígító és DMSO védőanyag alkalmazásával értem el (44. sz. ábra). Az adatok statisztikai elemzése során megállapítottam, hogy a hígító nem, de az alkalmazott védőanyag szignifikáns ($P=0,0338$) hatással volt a termékenyülési százaléokra.



44. sz. ábra: A mélyhűtött süllőspermával kapott termékenyülési eredmények (n=16, kontroll termékenyülés: 51,7%)

A kelési eredmények vizsgálatánál (más tejesek felhasználásával) a **legmagasabb kelési arányt** (41 ± 22 %) metanol védőanyag használata és 1:1 hígítási arány mellett kaptam (45. sz. ábra), azonban az eredmények statisztikai elemzése nem mutatott ki szignifikáns különbséget a kelési eredmények között.

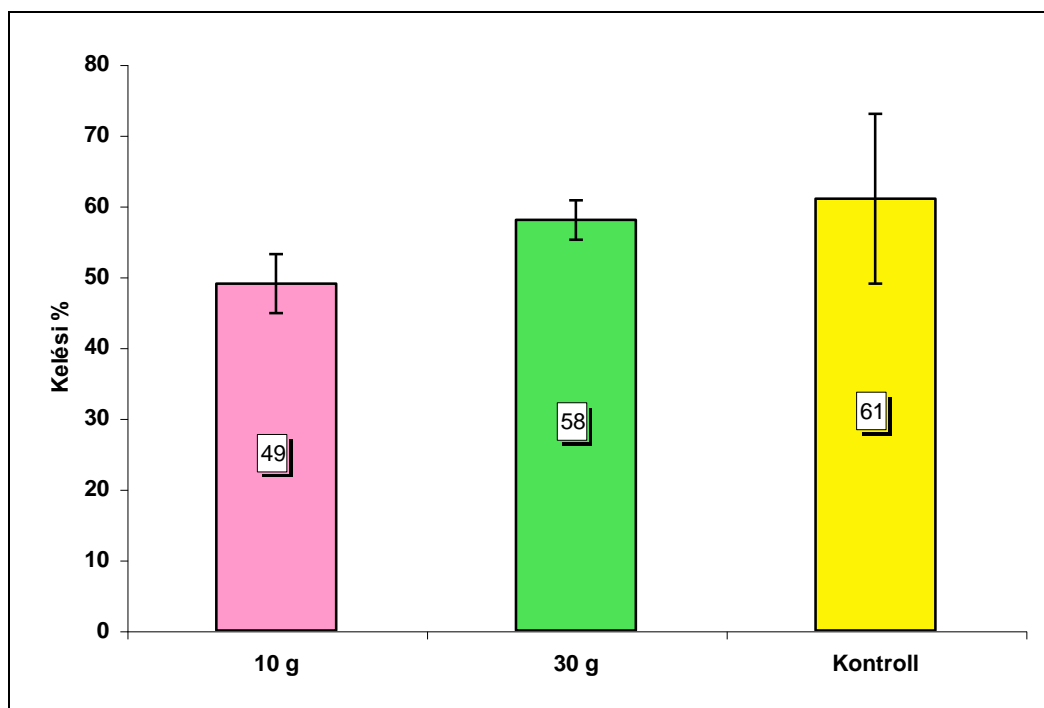


45. sz. ábra: Kelési eredmények a hígítási arány és a védőanyag függvényében (n=13)

A mélyhűtött süllő sperma **keltetőházi felhasználása** során a sperma vizelettel való keveredését kiküszöböltem. A katéteres spermavétel eredményeként a frissen fejt süllő sperma motilitása 63 ± 10 % lett. A spermakonzentráció a kísérletben

$1,8565 \pm 0,1547 \times 10^{10}$, míg az 1 g-ban található ikraszemek száma 1351 ± 61 volt, így az egy ikraszemre jutó spermiumok száma a 10 g-os ikratétel esetében $3,396 \times 10^5$, a 30 g-os ikratételek esetében $1,132 \times 10^5$ körül alakult. A felolvasztás utáni motilitás esetében $53 \pm 5\%$ volt, így a frissen fejt és a felolvasztott minták motilitás értékei között szignifikáns különbség nem volt ($P=0,1135$).

Amikor 10 g ikrát termékenyítettem 1 műszalmányi mélyhűtött spermával a kikelt lárvák aránya $49 \pm 4\%$ volt, míg 30 g ikra termékenyítésekor $58 \pm 3\%$. A két eredmény között ugyan nem találtam statisztikailag szignifikáns eltérést, azonban a t-próba eredménye ($P=0,05701$) nagyon közel áll a szignifikancia-szinthez. Meglepő módon, amikor 50 g ikrát termékenyítettem egy műszalmányi felolvasztott spermával 87 %-os kelést tapasztaltam, igaz ebben az esetben ismétlés nem volt, az ábrán ezt az eredményt nem tüntettem fel (46. sz. ábra).



46. sz. ábra: Az 1 műszalmával termékenyített különböző ikratételek kelési eredményei (n=13)

3.5.10. Következtetések

A felolvasztás után a spermiumok motilitása csökkent, azonban minden esetben maradt életképes spermium. Vizsgálataim során a legmagasabb motilitást és termékenyülési százalékot a **felolvasztás után 10% DMSO védőanyag alkalmazásával, 3 perces egyensúlyozással kaptam**. Az adatok statisztikai feldolgozása során megállapítottuk, hogy nincs statisztikai szignifikáns különbség az egyes felolvasztás utáni motilitás eredmények között.

A legnagyobb problémát a kísérletek során az jelentette, hogy a fejés közben elkerülhetetlen volt az **ivartermék vizelettel való szennyeződése**. Így már eleve alacsonyabb fagyasztás előtti motilitást kaptam. Ez a keveredés aktiválja a spermiumokat, így pl. a pontyspermiumok ATP-raktárai kiürülnek (Perchec et al., 1995), míg atlanti lazac esetében Honeyfield és Krise (2000) kimutatták flow citométeres vizsgálat segítségével, hogy az élő sejtek száma csökken.

Ezt a problémát sikerült elkerülni **katéteres fejéssel** úgy, hogy közvetlenül az ivari vezetékbe helyezett cső segítségével nyertem a spermát, így elkerülhető a szennyeződés okozta minőségromlás.

A mélyhűtési technika kialakítása során a DMSO védőanyag jobb termékenyülést eredményezett a metanolnál, azonban a keltetőházi kísérletben a metanollal termékenyített ikratételek produkáltak jobb eredményt.

Érdekes megállapítás, hogy más szerzőkkel ellentétben a hűtés során a legjobb eredményeket a DMSO védőanyag esetében kaptam. Tokféléknél a 10%-os metanol védőanyag alkalmazásakor kapták a legmagasabb motilitást egyensúlyozás nélkül, bár itt statisztikailag nem találtak szignifikáns különbséget a védőanyagok hatása között (Horváth 2001).

A pontyfélék spermájának mélyhűtése során az esetek döntő többségében DMSO-t használtak és ez bizonyult a leghatékonyabb védőanyagnak (Moczarski, 1977; Kurokura et al., 1984; Koldras és Bieniarz, 1987; Cognie és Billard, 1989; Magyary et al. 1996a), azonban ismeretes olyan hazai eredmény, ahol a metanol védőanyag használata során kiugróan magas termékenyülési százalékot (80 % körüli) értek el (Horváth, 2001).

A DMSO a harcsaalakúknál is a gyakran használt védőanyagok közé tartozik (Márián és Krasznai, 1987; Linhart et al., 1993; Tiersch et al., 1994; Otémé et al., 1996), ám az afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) esetében kevésbé bizonyult sikeresnek a vele történő hűtés során, helyette a glicerin használata során kaptak magasabb eredményeket (Steyn et al., 1985). Ellenben a metanol alkalmazására is számos példa mutatkozik: harcsaféléknél (Steyn, 1993; Steyn és Van Vuren, 1987), tokfélék (Glogowski et al., 2002; Horváth et al., 2005), pisztrángfélék (Lahnsteiner et al., 1997) és tilápia fajok (Harvey, 1983) esetében alkalmazták sikerrel.

Tehát levonható a következtetés, hogy a két védőanyag preferenciájára nem elegendő csak a felolvasztás utáni motilitást és a termékenyülést figyelembe venni, hanem a keléssel bezárólag lehetséges a következtetések megállapítása. Összességében az eredményekből arra következtettem, hogy a **metanol-glükóz kombináció, 1:1 arányban hígítva** a spermával alkalmasnak tűnik a süllő sperma mélyhűtésére.

Mélyhűtési kísérleteim során különösen fontosnak tartottam a **nagyméretű műszalmával** történő vizsgálatokat, mivel ezen tételekkel lehet üzemi szintű munkákat végezni. A bemutatott eredmények reménykeltőek, de még szükség van a nagyobb ikratételeken tesztelni a módszer hatékonyságát (lásd: 50 g-os ikranagyság).

3.5.11. Javaslatok

- Javaslom a süllő esetében a glükóz alapú hígító és 10%-os metanol védőanyag, 1:1 hígítási arány alkalmazását, mind a laboratóriumi, mind a gyakorlati alkalmazás során.
- Javaslom a kidolgozott technológia további vizsgálatát nagytételű ikraadagokban.
- Javaslom a módszer alkalmazási lehetőségeinek vizsgálatát kiterjeszteni más sügérfélékre.
- A metodika jelenlegi fejlettségi állapotában alkalmazható génbanki munkák hatékony és biztonságos elvégzésére, így ezen irányú felhasználását javaslom.
- A mélyhűtés során kapott eredmények nem elegendőek a standardizálás alap kritériumainak lefektetéséhez és bevezetéséhez, ezért további kísérletek elvégzését javaslom.

3.6. Kísérleti munka és eredmények bemutatása kecsge fajon

3.6.1. Bevezetés

Az ősi eredetű tokfélék közül számos faj kis populációkban, elszigetelten él, ennek következtében fokozottan fennáll a kihalás veszélye. A folyók szabályozása, vízierőművek és vízlépcsők építése megnehezíti, sőt bizonyos esetekben teljesen megakadályozza a többségében anadrom tokfajok szaporodását. A vizek szennyezése ugyancsak komoly gondot jelent. Ennek eredményeképpen néhány folyóból egyes tokfajok teljesen eltűntek. A volt Szovjetunió területén, ahol a föld legnagyobb tok populációi élnek, ellenőrizhetetlenné vált a halászat. Ezeken a területeken a megélhetési gondokkal küszködő embereknek jó bevételi forrást jelent az értékes ikrájú, kaviárt adó tokfajok orvhalászata és lemészárlása, ami szintén nagy veszélyt jelent a tokfélékre nézve. Az emberiség nem engedheti a genetikai diverzitás további degradációját, nem eshetnek újabb fajok az emberi „fejlődés” áldozatául. Amíg a tiszai ökológiai katasztrófához hasonló események történhetnek régiókban és a Föld egyéb területein addig kiemelten nagy jelentősége kell, hogy legyen a mélyhűtésnek, mint az ex situ génmegőrzés egyik igen fontos elemének, amely közelebb vihet minket a veszélyeztetett fajok, köztük a tokfélék megmentéséhez.

A tokfélék spermamélyhűtési technológiájának kidolgozására a legalkalmasabb kísérleti faj a kecsge (*Acipenser ruthenus*), mivel a kísérleti tapasztalatok jól alkalmazhatók más tokfajokra is és ezen kívül a kecsge viszonylag nagy számban fordul elő a hazai vizekben (47. sz. ábra).



47. sz. ábra: Kecsege (forrás: <http://tankonyvtar.hu>)

3.6.2. A kutatómunka időbeli és térbeli bemutatása

A bemutatott eredmények a 2002-2004. év közötti időszak kutatásaiból származnak. A kísérletekhez szükséges ivarérett kecsgék a Dunából, Ercsi mellől származtak. A **kísérletek két helyszínen folytak**, a szarvasi HAKI és a SZIE, MKK-KTI Halgazdálkodási Tanszéken, ahol csak teljes egyedekkel dolgoztam. A kísérleti példányok szállítása 1 m³-es tartályokban történt. Mindkét helyen recirkulációs rendszerű kádakban, 16-18 °C-os vízben, ivar szerint szétválogatva tartottam a kecsgeket. A kádak ürtartalma Gödöllőn 2 m³, míg Szarvason 8 m³ volt.

3.6.3. Az ivartermékek elvétele

A spermiáció és az ovuláció kiváltására Szarvason tokhipofízis kivonatot alkalmaztam. Tejesek esetében 4,5 mg/ttm kg, ikrások esetében pedig 3 mg/ttm kg hipofízis kivonatot adtam 0,65 %-os NaCl oldatban feloldva, a hasüregbe fecskendezve. Gödöllőn 0,65 %-os NaCl oldatban feloldott GnRH analógot (Ovopel GnRHa) fecskendeztem be a hátizomzatba, ttm kg-onként 1 golyó GnRHa-t számítottam.

A tejesek fejése 24 órával a hormonindukció után történt. Az állatok hasi és farki részét szárazra töröltem, majd a hasfal ivarnyílás felé történő enyhe nyomásával nyertem ki a spermát, amit száraz műanyag tálakban, illetve műanyag poharakban fogtam fel és a kísérletek megkezdéséig 4 °C-on tároltam hűtőszekrényben. A bélsárral és vizelettel szennyezett spermát nem használtam fel.

Az ikrásokat 24 órával a hormonindukció után folyamatosan megfigyelés alatt tartottam. Amennyiben a kádak alján ikraszemeket találtam, próbafejéssel megkerestem az ovulált egyedeket. Ezeknek az egyedeknek a hasfalát felnyitva száraz műanyag tálakba nyertem ki az érett ikrát, amelyet felhasználásig szintén 4 °C-on tároltam (48. sz. ábra).



48. sz. ábra: A kecsege ikrás fejése (fotó: Szabó T., 2004)

3.6.4. A mélyhűtés menete

A vízzel aktivált spermiumok motilitás vizsgálatát fénymikroszkóppal, 600×-os nagyításon végeztem a következő két szempont alapján:

- 1) Haladó mozgást végző spermiumok százalékos aránya.
- 2) A haladó mozgás intenzitása.

A sperma: hűtőműködő arány 1:1 volt. A tesztelendő hűtőműködőket többszöri ismétlésben vizsgáltam. A hűtőműködő előállításához **három különböző**, előre elkészített és felhasználásig 4 °C-on tárolt **hígítót** használtam:

- Jähnichen-féle hígító: 25 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH=8,5 (Jähnichen et al., 1997).
- Tsvetkova-féle hígító: 23,4 mM szacharóz, 118 mM Tris-HCl, pH=8,0 (Tsvetkova et al., 1996).
- Módosított Tsvetkova-féle hígító: 23,4 mM szacharóz, 30 mM Tris-HCl, 0,25 mM KCl, pH=8,0 (Urbányi et al., 1998).

Ezekhez a hígítókhoz adtam különféle mennyiségben a **négyféle tesztelendő krioprotektánst**: dimetil-szulfoxid (DMSO) 10% végső koncentrációban; dimetil-acetamid (DMA) 10% végső koncentrációban; etilén-glikol (EG) 10% és 17,5% végső koncentrációban; metanol (M) 5 %; 7,5%; 10 % végső koncentrációban. Equilibrációs idő nem volt.

A mintákat 500 µl-es műszalmákba szívtam fel automata pipettával és azonnal hűtöttem. A **hűtést hordozható polisztirol dobozban**, folyékony nitrogén gőzében végeztem. A műszalmákat egy a nitrogén felszínén úszó, 3 cm magas polisztirol keretre helyeztem el, majd három perc elteltével a nitrogénbe dobtam őket.

A felolvasztást 40 °C-os vízfürdőben 13 másodpercig végeztem. A felolvasztás után megvizsgáltam a spermiumok vízzel való aktiválhatóságát és motilitását (haladó mozgást végző spermiumok százalékos aránya, haladó mozgás intenzitása).

3.6.5. Termékenyítés mélyhűtött spermával

A termékenyítési kísérletekhez felhasznált egyedektől származó ikrát csoportokra osztottam és száraz, steril műanyag Petri-csészébe helyeztem (**átlag 10 g-os csoportokat alakítottam ki**). Egy ikracsoport termékenyítésére fél műszalmányi kezelt spermát (250 µl = 125 µl tiszta sperma) használtam, amelyet termékenyítés előtt vízzel hígítottam 1:1 arányban, így az ikrára már aktivált állapotban kerültek a spermiumok. Ezután feltöltöttem a Petri-csészéket vízzel és óvatos körkörös mozdattal biztosítottam az ikrák és a spermiumok megfelelő keveredését. A megtermékenyült ikraszemeket hagytam letapadni a Petri-csésze aljára. A kontroll termékenyítését 125 µl natív spermával végeztem.

A megtermékenyült ikraszemek inkubációját 36 órán keresztül végeztem átfolyó-vizes rendszerben. Szarvason műanyag vályúkban áramoltatott vízbe helyeztem a Petri-csészében lévő ikrát. A termékenyülési százalékot preparáló mikroszkóppal, 10×-es nagyításon, korai neurula stádiumban vizsgáltam, mivel ebben az állapotban már nem jelentenek zavaró hatást a pseudo-parthenogenetikus úton fejlődő ikraszemek.

3.6.6. Az adatok statisztikai feldolgozása

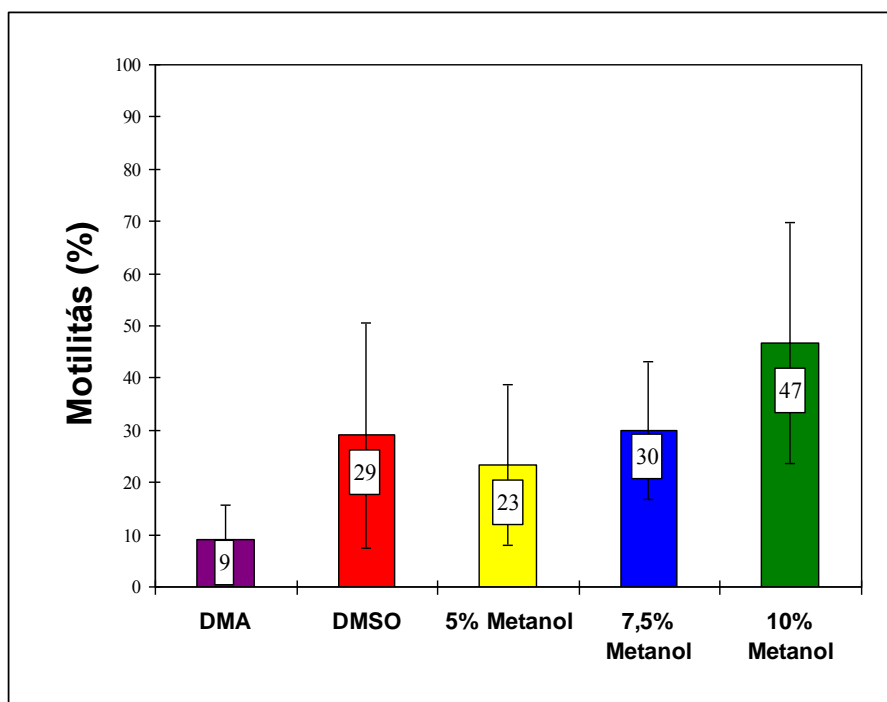
A felvett adatok statisztikai feldolgozását egyszempontos varianciaanalízissel végeztük a GraphPad InStat statisztikai segédprogram segítségével.

3.6.7. Eredmények

A natív (kontroll) sperma motilitása 56,2±23,2% volt. Etilén-glikolra vonatkozó adatokat nem közlök, mivel alkalmazása esetén nem tapasztaltam kimutatható motilitást.

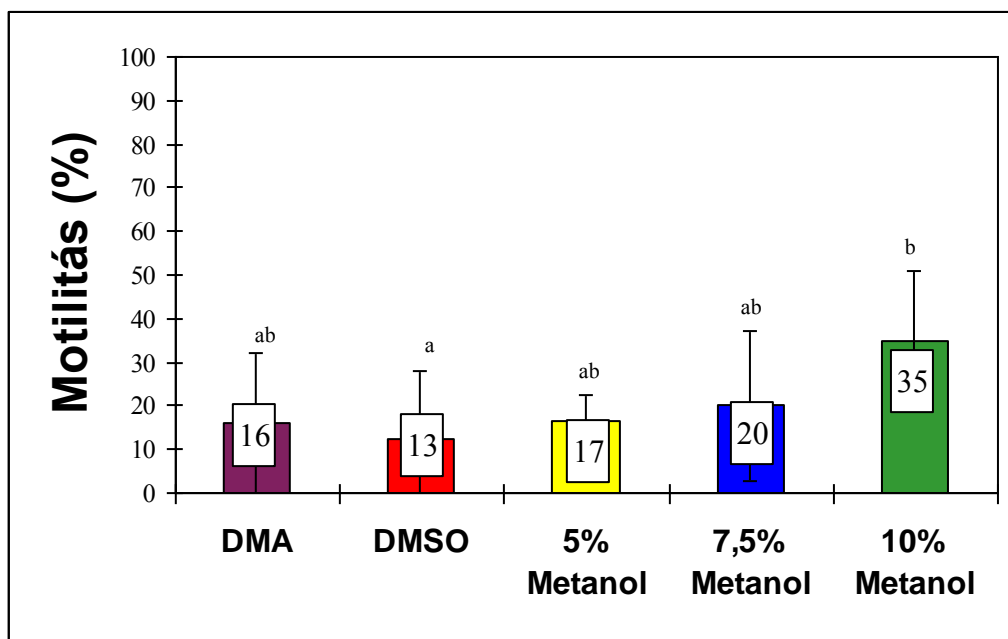
A Tsvetkova-féle hígító esetében különböző fagyásvédő anyagok alkalmazása nem eredményezett szignifikánsan ($P \leq 0,05$ szignifikanciaszint mellett) eltérő

eredményeket (49. sz. ábra). Mindemellett a legjobb motilitási átlagértéket a metanol használatakor kaptam, 10%-os végkoncentrációnál: $46,7 \pm 23,1\%$ -ot. A metanol végkoncentrációjának csökkentésével csökkent a felolvasztás utáni motilitás is.



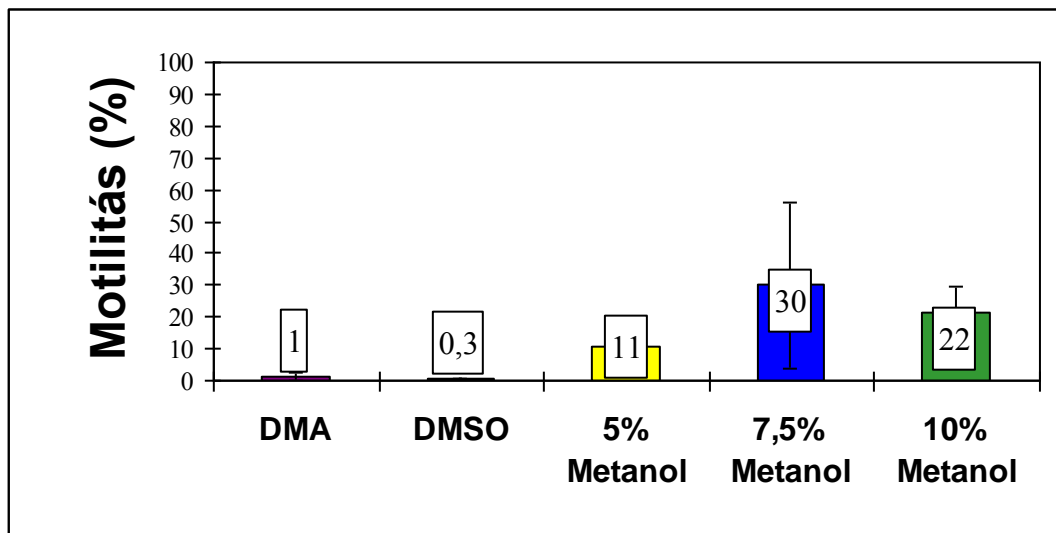
49. sz. ábra: Az eredeti Tsvetkova-féle hígítóval elért felolvasztás utáni motilitási eredmények (n=11)

Módosított Tsvetkova-féle hígító esetében a DMSO 10%-os és a metanol 10%-os alkalmazása között észleltem szignifikáns ($P \leq 0,05$) különbséget (50. sz. ábra). A legjobb felolvasztás utáni motilitást, $35,0 \pm 16,0\%$ -ot, 10 %-os metanol alkalmazása eredményezte.



50. sz. ábra: A módosított Tsvetkova-féle hígítóval elért felolvasztás utáni motilitási eredmények (n=11)

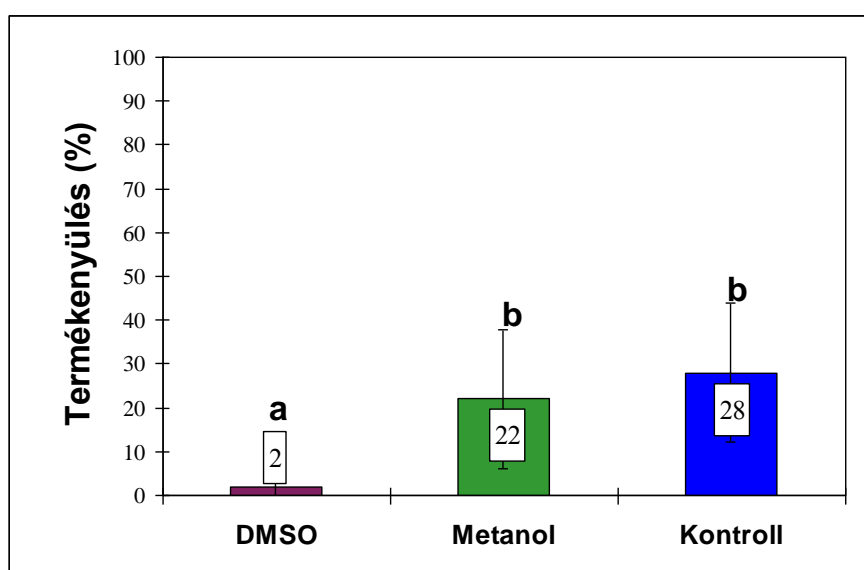
A **Jähnichen által kidolgozott hígító** használatakor a felolvasztás utáni motilitást illetően szintén a DMSO 10%-os és a metanol 10 %-os végkoncentrációban történő alkalmazása között tapasztaltam szignifikánsan ($P \leq 0,05$) kimutatható különbséget (51. sz. ábra). A legjobb átlagos motilitási értékeket, $30,0 \pm 26,0\%$ -ot, $7,5\%$ -os végkoncentrációban alkalmazott metanol esetében kaptam.



51. sz. ábra: A Jähnichen-féle hígítóval elért felolvasztás utáni motilitási eredmények (n=11)

Az előzetes vizsgálatokban **legjobb eredményeket mutató hűtőmedium kombinációkat kiválasztva** a módosított Tsvetkova-féle hígító és a védőanyagok 10%-os végkoncentrációban történő alkalmazásával hajtottam végre termékenyítési kísérleteket.

A legjobb eredményeket 10%-os metanol használatával értem el: $22,01 \pm 15,84\%$ -ot. Ez a **termékenyülési százalék** szignifikánsan ($P \leq 0,05$) nem tér el a natív spermával végzett termékenyítés eredményeitől (52. sz. ábra). A DMA esetén a tapasztalt termékenyülés 0% volt, így ez a védőanyag nem szerepel a grafikonon.



52. sz. ábra: Mélyhűtött kecsge spermával elért termékenyülési eredmények (n=8)

3.6.8. Következtetések

A spermamélyhűtésben elengedhetetlen a sperma hígítása hűtőmediummal. A **hűtőmediumot alkotó hígítók és fagyásvédő anyagok tesztelése** hozzásegít az alkalmazott kémiai anyagok közül a **legmegfelelőbbek kiválasztásához** és helyes arányban történő alkalmazásához. A gyakorlatban is használható eredmények eléréséhez azonban szükséges a mélyhűtött spermával történő termékenyítés eredményességének vizsgálata is. A cél a natív spermával történő termékenyítés hatékonyságának megközelítése volt.

Kísérleteim eredményei alapján **megállapítható**, hogy az eltérő hígítók használatával nem tapasztalhatunk jelentős felolvasztás utáni motilitási különbségeket, így **a motilitásra nézve nincs jelentősége annak**, hogy cukortartalmánál fogva immobilizáló (Tsvetkova-féle hígító), sótartalmánál fogva immobilizáló (Jähnichen-féle hígító) vagy só és cukrot is tartalmazó hígítót alkalmazunk. Szignifikáns eltéréseket a felolvasztás utáni motilitásban a módosított Tsvetkova és a Jähnichen-féle hígítók között csupán a DMSO és a DMA, mint védőanyagok alkalmazása esetén kaptam. Mindkét védőanyag használatával a sótartalmú Jähnichen-féle hígító igen rossz eredményeket adott, így az említett kombinációk nem alkalmasak a kecsge spermájának eredményes mélyhűtésére. Az a tény, hogy a tesztelt hígítók felolvasztás utáni motilitásra gyakorolt hatása között nincs szignifikáns különbség, valószínűsíti, hogy a termékenyítőképeségben sem mutatkozna jelentős különbség.

A DMSO elterjedten használt védőanyag a tokfélék spermájának mélyhűtésére (Drokin et al., 1991, Cherepanov et al., 1993, Tsvetkova et al., 1996). A metanol védőanyag alkalmazását tokféléken Horváth (2001) kísérte meg először, és kapott igen biztató eredményeket.

A Tsvetkova-féle és a módosított Tsvetkova hígító közti különbség elsősorban a módosított hígítóhoz adagolt 0.25 mM KCl-ban van. Ez összhangban áll Gallis et al. (1991) feltételezésével, hogy a tokfélék spermája esetén az immobilizációért elsősorban a K^+ -ionok felelősek. A Jähnichen-féle hígító igen egyenetlen felolvasztás utáni motilitást eredményezett az összes védőanyag és azok kipróbált koncentrációi mellett.

Az etilén-glikol az alkalmazott koncentrációban (10% és 17,5%) erősen károsította a spermiumokat, azok mozgásképtelenségét okozva. Így megállapítható, hogy az etilén-glikol ezekben a végkoncentrációkban nem alkalmazható a kecsge spermájának mélyhűtésében.

A **DMA 10%-os végkoncentrációban történő alkalmazásával** a Tsvetkova-féle hígító esetében viszonylag gyenge, a Jähnichen-féle hígító esetében pedig igen gyenge felolvasztás utáni motilitást tapasztaltam. A DMA-val kezelt, módosított Tsvetkova-féle hígítóval hígított sperma bár viszonylag jó motilitást mutatott, termékenyítésre egyáltalán nem volt alkalmas, mivel a kapott termékenyülési százalék gyakorlatilag 0 volt. Ezeknek az eredményeknek a tükrében nem javaslom a DMA alkalmazását a kecsge spermájának mélyhűtésében.

A **DMSO-val végzett kísérleteimben** a Tsvetkova-féle hígító használatával tapasztaltam a legjobb felolvasztás utáni motilitást, míg a Jähnichen-féle hígító alkalmazásával igen rossz eredmények születtek. A termékenyítési vizsgálatok során a módosított Tsvetkova-féle hígítóval hígított és DMSO-val kezelt sperma termékenyítőképesége szignifikáns eltérést mutatott a kontrollhoz képest és igen gyenge volt, így ezeknek az adatoknak az ismeretében a DMSO-t sem javaslom krioprotektív alkalmazásra kecsge esetében.

A **metanol** különböző töménységekben történő alkalmazásával viszonylag **jó felolvasztás utáni motilitási értékeket kaptam**, amelyek rendszerint csak kis mértékben különböztek a kontrolltól. Tehát a metanol az alkalmazott koncentrációkban nem csökkenti jelentősen a spermiumok felolvasztás utáni motilitását. A termékenyítési kísérletekben felhasznált, metanollal 10%-os végkoncentrációban kezelt sperma hígítására a módosított Tsvetkova-féle hígítót használtam. Ennek a kombinációnak az alkalmazásával **igen jó**, a kontrolltól szignifikánsan nem különböző **termékenyülési százalékokat tapasztaltam** és ez azt mutatja, hogy a metanol kiválóan alkalmazható a kecsge spermájának mélyhűtésében.

Eredményeim alapján feltételezem, hogy a tokfélék esetében a mélyhűtött spermával történő **termékenyítési kísérletek relatív kudarc elsősorban a használt védőanyagnak tudható be**. Ennek oka többféle lehet. A DMSO, illetve az azzal történő mélyhűtés károsíthatja a spermiumok flagellumát és a sejtek mozgató mechanizmusát, mint azt Billard et al. (2000) megfigyelték. A DMSO jelenléte okozhatja az akroszóma sérülését is. A spontán akroszómareakciót kiváltó hatása valószínűtlen, Cherr és Clark (1984) vizsgálatai alapján ezért elsősorban a magas Ca^{++} -koncentráció és magas pH felelősek, míg a DMSO hatásának kitett spermiumok között kimondottan alacsony volt a spontán akroszómareakción átment sejtek aránya. Ettől függetlenül, mivel az akroszóma a tokfélék termékenyülésének egyik létfontosságú és igen sérülékeny organelluma, feltételezhető, hogy a DMSO nem fejt ki rá megfelelő védőhatást, viszont a metanol igen.

Az a tény, miszerint eltérő védőanyagok alkalmazásával a felolvasztás utáni motilitási százalékokban kisebb eltérések tapasztalhatók a termékenyülési százalékokban, arra enged következtetni, hogy a **krioprotektánsok toxikus hatása nem realizálódik teljes mértékben a felolvasztás utáni motilitás szintjén**, hanem a termékenyülés folyamata során további káros hatások jelentkeznek. Ez adódhat abból, hogy a védőanyagok elsősorban nem a mozgásért felelős részeket, sejtorganellumokat (pl.: farokrész, mitokondriumok, stb.), hanem a megtermékenyítésben résztvevő elemeket (pl. akroszóma) károsítják, illetve a fagyásvédő anyagok a kezelt spermával együtt az ikrára kerülve eltérő mértékben károsítják az ikraszemeket is, így toxikusságuk hatványozottan jelentkezik.

3.6.9. Javaslatok

- Javaslom tokfélék spermamélyhűtésében a metanol védőanyag alkalmazását a DMSO helyett.
- Javaslom a tokfélék mélyhűtött spermájának üzemi szintű használatát szaporítás és hibridizáció céljára.
- Javaslom nagyobb volumenű műszalmák alkalmazási lehetőségeit kipróbálni tokféléken.
- Javaslom a módszer génbanki alkalmazását, mind hazai, mind nemzetközi viszonylatban.
- Javaslom a módszer alkalmazásakor elért eredményeket és kidolgozott metodikát a mélyhűtési technológia standardizálási követelményeinek kialakításánál figyelembe venni és felhasználni.

3.7. A standardizálás lehetőségeinek vizsgálata a kapott eredmények alapján

3.7.1. Bevezetés

A halaknál végzett mélyhűtési technikák, technológiák kismértékben terjedtek el ezidáig a gyakorlatban. Eddig elsősorban génbanki célzattal és felhasználással alkalmazták a technológiát, a gazdasági haszon-emplős állatokhoz mérhető felhasználásról nincs információ.

Joggal merül fel a kérdés, mi hátráltatja a technológia elterjedését, milyen lépések szükségesek ahhoz, hogy a gyakorlat oldaláról valós igényként merüljön fel a mélyhűtött sperma üzemi szintű alkalmazása?

A disszertációban vizsgált halfajokon végzett kutatómunkámból, illetve a PhD fokozat megszerzése óta folytatott, a jelen dolgozatban nem tárgyalt tapasztalatokra és eredményekre hagyatkozva igyekszem felvázolni az ok-okozati tényezőket.

3.7.2. A mélyhűtés teljesítmény fokozásának szükséges kritériumai

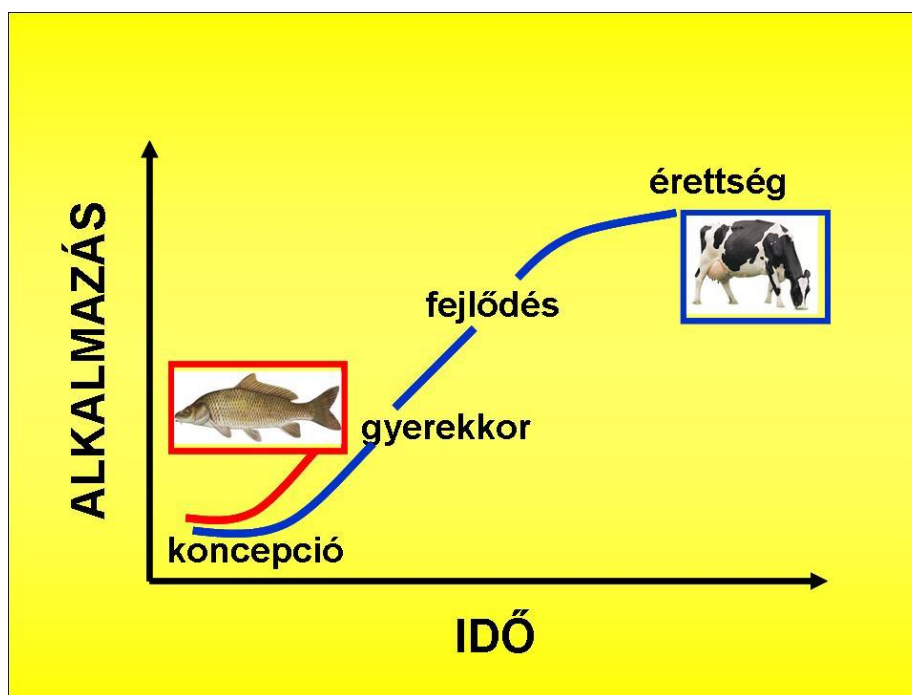
Ahhoz, hogy a mélyhűtés elfogadott teljesítményt produkáljon, több, a gyakorlati felhasználói oldalról jövő **jogos kritériumnak** kell megfelelnie:

- **Hatékony, nagy volumenű termelés:** ezen kritérium alapja, hogy a gyakorlati oldal biztosítani tudja a nagymennyiségű ivarterméket (jó minőségben és pontosan), míg a kutatói oldalnak megfelelő felszereltséggel (berendezések, oldatok, eszközök stb.) kell rendelkeznie ahhoz, hogy készen álljon a nagy volumenű sperma feldolgozására és mélyhűtésére.
- **Egyszerű technológia:** a felhasználók alapvető igénye, hogy a bevezetett, vagy alkalmazni kívánt technológia egyszerű legyen, könnyen elsajátítható lépéseket tartalmazzon, és alkalmazása ne feltételezzon kimagasló biológiai jártasságot. Ennek hiányában is lehet „egyszerű” technológiáról beszélni, abban az esetben, ha a kutatói oldal szolgáltatásként végzi a sperma mélyhűtést és azzal a szaporítás segítségét.
- **A termékek egységesítése:** a technológiában számos lehetőség nyílik a fejlesztők számára, hogy a mélyhűtés végeredményét képező terméket, magát a spermaadagokat hogyan és milyen formában állítják elő a felhasználásra. A szarvasmarha esetében a 0,25 és 0,5 ml-es műszalmák mellett döntöttek, míg a lótenyésztők a nagyobb, 3-5 ml-es műszalmákat preferálják. A haltenyésztés során a felhasználási cél alapvetően befolyásolhatja a kiserelést, és így a termék megjelenését is. Génbanki célzattal elegendőek a kisebb műszalmák (0,25-0,5 ml), míg az üzemi felhasználásnál, ismervé pl. a ponty szaporítás során az anyánkénti 1 kg-ot is meghaladó ikra mennyiséget, a nagyobb űrtartalmú (5 ml, vagy annál is nagyobb) műszalmák, vagy tárolók bevezetése indokolt.
- **Minőség ellenőrzés és biztonság:** a felhasználók jogos elvárása, hogy a mélyhűtött ivartermék minőségben legalább olyan paraméterekkel rendelkezzen, mint a frissen fejt natív sperma. Emellett a tárolás során ez a minőség ne romoljon, vagyis a minőséget a fagyasztott ivartermék biztonságosan őrizze meg a felhasználásig. Fontos hangsúlyozni, hogy nem elegendő csak és kizárólag a felolvasztott sperma minőségét alapul venni, mint minőségi minimum. A disszertációban bemutatott eredmények is alátámasztják, hogy a minőség legfontosabb jelzője a termékenyítőképesség, és végezetül a kelés, a kikelt lárvák %-os aránya.

- **Standardizáció és harmonizáció:** A módszer alkalmazásának egyik fő kritériuma, hogy egységesíteni szükséges a különböző technikákat. Még egy halfaj esetében is számtalan technika és eljárás létezik (pl. ponty esetében 6, kisebb-nagyobb mértékben különböző), melyek gátjai a standard folyamat kialakításnak és bevezetésnek. Emellett a különböző halfajok spermahűtésének, a tengeri és édesvízi halfajok technikáinak harmonizálni kell-kellene egymással, hogy minimális változtatással a különböző technikák adaptálása problémamentesen megtörténhessen. Továbbá a harmonizációnak szükséges kiterjedni a mélyhűtést magasfokon, rutinszerűen alkalmazó ágazattal és szektorral (pl. szarvasmarha tenyésztés).
- **Génbanki-tárolási rendszerekkel kapcsolat:** A technológia bevezetésének legkézenfekvőbb megoldása lehet, ha csatlakozni tud az egyes országokban már működő, szarvasmarhára alapozott mesterséges termékenyítő állomás hálózathoz. Ezen hálózatok múltja, tapasztalata nagyban elősegíti a hal sperma használatának gyakorlati elterjedését és elterjesztését.

3.7.3. A hal ivarsejtmélyhűtés fejlődési lehetőségei

Amennyiben áttekintjük a halivarsejt-mélyhűtés jelenlegi fejlettségi állapotát, és megpróbáljuk összevetni a gyakorlatba már bevezetett, és gazdasági jelentőséggel bíró szarvasmarha ivarsejt és embrió fagyasztás fejlettségével, alapvetően szomorú képet kapunk, amit az 53. sz. ábra illusztrál.



53. sz. ábra: A szarvasmarha és a hal ivarsejt mélyhűtés fejlettségi állapotának illusztrálása

Míg a szarvasmarha tenyésztésben és szelekciós munkában a mélyhűtési technológiának kiemelt szerepe van, addig a **halivarsejt-mélyhűtés még csak kezdetleges felhasználási és alkalmazási szinten van.**

Fontos elkülöníteni a kutatás-fejlesztés során alkalmazott dimenziókat és metodikát az iparszerű alkalmazásba történő bevezetés minimum követelményeitől,

melyek hiánya megkérdőjelezi a módszer gazdasági alkalmazhatóságát. Ezen tényezőket veti össze és mutatja be a 8. sz. táblázat.

8. sz. táblázat: A halivarsejt-mélyhűtéssel szemben támasztott követelmények összehasonlítása a két potenciális alkalmazási területen

Kísérleti volumen	Iparszerű volumen
Kézi munkaerő	Gépesített
Percek/minta kapacitás	Másodpercek/minta kapacitás
Néhány 10-100 minta/nap	1000 minta/nap
Szárazjég, folyékony nitrogén	Programozható hűtőberendezés
Egyszerű, manuális jelölés	High tech címkézés
Egyszerű, manuális töltés	Megbízható töltés
Hígított minták	Sejt koncentrációs sorozatok
Minták nagy változatossága	Minták alacsony változatossága
Alacsony standardizáltsági fok	Magas standardizáltsági fok
Csekély minőség ellenőrzési szint	Magas minőség ellenőrzési szint
Alacsony kezdeti beruházás igény	Magas kezdeti beruházás igény
Magas mintánkénti költséghányad	Alacsony mintánkénti költséghányad

A táblázat jól szemlélteti, hogy az a módszertan, mely kis volumenű, elsősorban kísérleti vagy csak csekély egyedszámú, elsősorban természet- és környezetvédelmi céllal (génmegőrzés) kerül kialakításra nem alkalmas a nagymennyiségű igénnyel fellépő és gyors-precíz metodikát feltételező iparszerű termeléssel.

Ezt a **kontrasztot növeli**, hogy napjainkban olyan „high-tech” berendezéseket alkalmaznak, melyek a szakszerű, hibánélküli, gyors ivarsejt mélyhűtést (elsősorban spermamélyhűtést segítik. Ilyen automata eszköz pl. automata címkéző (bár kód számot nyomtat a műszalmára), töltő és lezáró berendezés, mely akár 1000 db szalma kapacitást is elér óránként.

Határozottan kijelenthetem, hogy a kísérleti volumen és az iparszerű volumen közötti különbséget nem lehet anélkül áthidalni, hogy ne lépésről-lépésre, **szisztematikusan fejlesszük a technológiát**. A nagy teljesítményű mélyhűtéshez az átmenetet az alábbi 3 pont figyelembevételével javasolnám végrehajtani:

1. Az eljárás minden lépésének önálló, egyenkénti fejlesztése, illetve az egyes lépések közötti interakciók meghatározása,
2. A lépések racionalizálása és bevezetése a módszertanba többszörös ismétléseket követően,
3. A módszertan standardizálása alkalmazhatósági kritériumok elsődleges figyelembevételével, a hatékonyság átfogó javítása és tökéletesítése objektív paraméterek (felolvasztás utáni motilitás, termékenyülési és kelési arány) alapján.

A fentiek alapján a kritikus metodikai és a technológiai lépéseket az alábbiakban határozhatom meg (9. sz. táblázat). Az egyes lépéseknél figyelembe vettem azokat a technikai elemeket is (CASA és spektrofotométer), melyeket disszertációmiban nem alkalmaztam, viszont hiányukat és alkalmazhatóságukat megtapasztaltam, és a technológiai lépésekben használatukat fontosnak tartom.

9. sz. táblázat: A hal ivarsejt mélyhűtés metodikai és technológiai lépései

Metodikai lépések	Technológiai lépések
Minta gyűjtés	Minta gyűjtés és elemzés
	Motilitás vizsgálat
	Higítás
Minta feldolgozás	CASA analízisre előkészítés
	Motilitás minősítése
	Spektrofotométer vizsgálat
	Koncentráció vizsgálat és beállítás
Hűtés és osztályozás	Tároló közeg előkészítése
	Mélyhűtés előkészítése
	Equibráció és mintatöltés
	Hűtés
	Minták elrendezése és osztályozása
Tárolás	Hosszútávú tárolás
Felhasználás	Szállítás
	Felolvasztás és termékenyítés

A fentiekben általánosságban, a kísérleti tapasztalataimra hagyatkozva **igyekeztem rávilágítani a mélyhűtés standardizálási és kereskedelmi forgalomba hozatali aggályaira és lehetőségeire.**

Két nagyon fontos tényezőt azonban szándékosan kihagytam, mivel a gyakorlati észlelések és a tudomány jelenlegi állása szerint ezeknek a paramétereknek a befolyásolására egyelőre nem találhatunk megoldást:

- ⇒ Fajon belül, az egyes hímek termékenyítőképességének szórása, függetlenül attól, hogy a sperma minőség kitűnő volt,
- ⇒ Fajon belül, az egyes hímek által produkált sperma koncentráció közötti jelentős eltérés, mely paraméter a termékenyítés sikerességét alapjaiban meghatározhatja.

Összefoglalva a disszertációmban bemutatott 10 éves eredményeket, a következő állapotban látom jelenleg a halivarsejt-mélyhűtés iparszerű alkalmazásának helyzetét (10. sz. táblázat).

10. sz. táblázat: Az iparszerű halivarsejt-mélyhűtés fejlettségi szintje napjainkban

Fejlődési irány	Fejlődési lépések	Státusz
	Törvényi/politikai szemlélet fejlődés	Hiány
	Szállítási szabályozás	Hiány
	Költség szerkezet elemzés	Hiány
	Biológiai biztonság (Biosecurity)	Hiány
	Standardizálás	Hiány
	Minőség ellenőrzés	Részben kész
	Kereskedelmi méretű infrastruktúra	Részben kész
	Mélyhűtési volumen növelés	Elkészült
	Alap módszertan	Elkészült
	Alkalmazott kutatások	Elkészült

A saját tapasztalataim és a szakirodalom áttekintését követően, azok összegzéseként elkészítettem a halsperma-mélyhűtés SWOT elemzését, mely a 11. sz. táblázatban látható. Igyekeztem azokat a legfontosabb paramétereket figyelembe venni és felsorolni, melyek alapvetően befolyásolhatják ezen biotechnikai módszer elterjedését és gyakorlati bevezetését.

11. sz. táblázat: A halsperma-mélyhűtés SWOT analízise

<p>Erősségek</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ jól képzett kutatói csoportok, ⇒ megfelelő szakirodalmi adatbázis, ⇒ szakmaspecifikus workshopok és konferenciák, ⇒ relatíve fejlett műszaki infrastruktúra, ⇒ jó kommunikáció az egyes csoportok között, ⇒ előrehaladott kísérletek, számos halfajon, ⇒ jól működő rendszerek más gazdasági állatfajok esetén (pl. szarvasmarha). 	<p>Gyengeségek</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ körülményes mélyhűtési technológiák, ⇒ nem megbízható és nem ismételhető technológiák, ⇒ marketing teljes hiánya, ⇒ kevés adat gyakorlati tesztekéről, ⇒ kis mennyiségű ivartermék (0,5-1 ml) hűtése áll a kutatások fókuszpontjában, ⇒ gyenge tudás- és technológiatranszfer, ⇒ általános bizalmatlanság a mélyhűtött spermával szemben.
<p>Lehetőségek</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ probléma az egyes halfajok mesterséges szaporítási technológiájában, ⇒ veszélyeztetett halfajok számának növekedése, ⇒ nemesítési munka alacsony szintje a haltenyésztésben, ⇒ a mélyhűtés alkalmazása az iparszerű haltermelési technológiákban. 	<p>Veszélyek</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒ műszaki berendezések magas költségigénye, ⇒ a hazai haltenyésztési ágazat alacsony technológiai igényessége, ⇒ az új kutatási eredmények bevezetésének nehézségei a gyakorlatba, ⇒ a technikai színvonal alacsony szintje miatti piacvesztés.

4. Új tudományos eredmények

A disszertációban bemutatott halfajok spermamélyhűtési kutatómunkám során végzett kísérleteimben tapasztaltakból az alábbi új tudományos eredményeket és megállapításokat teszem:

1. Nagy egyedszámra alapozva meghatároztam egyes halfajaink hímivarsejtjeinek fagyasztása során a kritikus technológiai lépéseket, azon kritériumokat, melyek alapjaiban determinálják meg a hímivarsejtjeik mélyhűtésének sikerességét és eredményességét.
2. Ponty fajnál meghatároztam a hűtőmedium optimális összetételét: glükóz hígító és 10%-os metanol védőanyag végkoncentráció összetételben.
3. Ponty fajnál optimalizáltam a mélyhűtés kritikus tényezőit: 3 cm vastag polisztirol kereten 3 perc időtartamig folytatott mélyhűtés, hígítási arány 1:9 mértékben, míg a felolvasztás során a 40 °C-os vízfürdő 13 másodperc időtartamig bizonyult megfelelőnek.
4. A pontyféléken végzett kutatások során a bodorka, karikakeszeg és márna esetében a glükóz és 10% metanol együttese, míg dévérkeszeg esetében a fruktóz és 10% metanol produkálta a legjobb kelési eredményt.
5. Erős korreláció mutatkozik pontyfélék esetében a natív sperma motilitás és termékenyülési százalék, valamint a felolvasztott sperma motilitás és a kelési százalék között. Ezen paraméterek mérésével nagy biztonsággal prognosztizálható a mélyhűtés sikeressége.
6. A harcsa faj spermájának eltarthatósága növelhető, amennyiben a natív spermához cukoralapú hígítót: fruktózt vagy glükózt adagolunk.
7. Harcsa faj esetében optimalizáltam a nagy - 5 ml űrtartalmú - műszalma alkalmazásának körülményeit: 3 cm vastagságú polisztirol kereten 7 percre szükséges hűteni a spermaadagokat.
8. A harcsa mélyhűtésének kritikus paramétereit az alábbiakban határoztam meg: 1:1 hígítási arány, 6%-os fruktóz hígító és 10%-os metanol védőanyag (végkoncentrációban).
9. A mélyhűtést harcsa fajon alkalmaztam először üzemi méretű szaporítási technológia szerves elemeként, és kaptam a natív spermával végzett termékenyítésekkel megegyező eredményeket.
10. Süllő faj esetében a legmagasabb termékenyülési eredményeket a glükóz és 10%-os DMSO hűtőmedium adta, míg kelési eredményeknél a glükóz és 10%-os metanol kombináció bizonyult a legeredményesebbnek.
11. A süllő esetében a mélyhűtés kritikus elemeit az alábbiakban határoztam meg: 1:1 hígítási arány, 3 cm vastag polisztirol keret alkalmazása mellett 3 perces mélyhűtési időtartam, felolvasztás 40 °C-os vízfürdő-13 másodperc.
12. Kecsege fajon a mélyhűtés során a módosított Tsvetkova-féle hígító és a 10%-os végkoncentrációjú metanol alkalmazásával lehet a legjobb termékenyülési eredményt realizálni.
13. Tapasztalati úton meghatároztam a mélyhűtés teljesítmény fokozásának szükséges kritériumait, elkülönítettem és definiáltam a metodikai és technológiai lépéseket, és SWOT analízis alkalmazásával prognosztizáltam a hal hímivarsejt fejlődés lehetőségeit és korlátait.

5. Összefoglalás

Az MTA Doktori értekezésemben **egyes gazdasági haszonhalaink hímivarsejtjeinek (spermájának) mélyhűtési eredményeit tárgyalom**, mely kísérleteket 2001-2010. évek közötti időintervallumban végeztem kollégáimmal.

A disszertációm **legfontosabb célkitűzése** volt, hogy az eredmények prezentálása lehetőség szerint gyakorlati szemléletű megközelítést és bemutatást képviseljen, és egyben magában hordozza a tudományos igényességet, az új és újszerű megoldások világos ismertetését.

A **ponty** fajon végzett munkáim során kidolgoztam egy olyan mélyhűtési eljárást, melynek alkalmazásával biztonságosan lehet, elsősorban kisadagú ivarterméket hűteni. A 0,5 ml-es műszalma főképpen a génbanki megőrzésre alkalmas, viszont a mélyhűtés többi eleme már jól adaptálható nagyobb volumenű és nagyobb tároló eszköz alkalmazásának technológiájába. A glükóz hígító, a 10%-os metanol védőanyag alkalmazása, 1:9 hígítási arány, a 3 cm vastag polisztirol kereten végzett 3 perc időtartamú hűtés, valamint a 40 °C-os vízfürdőben 13 másodperc időtartamig folytatott felolvasztás alapját képezte és képzi ezen technika fejlesztésének, melyet számos kutatás és ezekből származó eredmény támaszt alá. A kidolgozott technológia bemutatásra került többek között könyvfejezetben (Urbányi és Horváth, 2008), valamint a módszer képezte a továbbfejlesztés alapját a nagyobb tároló eszközök alkalmazása felé (Horváth et al., 2007).

A **pontyféléken** végzett vizsgálatokat elsősorban gén és fajmegőrzési cézzal végeztem, melynek indukálása a tiszai ciánszennyezésre vezethető vissza. Kijelenthető, hogy a pontyon kapott eredmények kiválóan felhasználhatóak és átültethetőek a folyóvízi pontyfélék spermájának fagyasztási munkálataiba, azok tervezésébe és végrehajtásába. Az eredmények értékelése során nagyon szoros korrelációkat állapítottam meg egyes, a mélyhűtés sikerességét alapvetően befolyásoló paraméterek között. Ez a szoros összefüggés alátámasztja azt a feltételezést, hogy a sperma motilitás (mind a kiindulási, mind a felolvasztás utáni) nem nyújt kellő információt és nem biztosít megfelelő termékenyülést. A vizsgált halfajok esetében a dévérkeszegnél a fruktóz és 10%-os metanol kombináció, míg bodorka, karikakeszeg és márna fajoknál a glükóz és 10%-os metanol eredményezte a legjobb értékeket. A halfajok mélyhűtési eredményeiről beszámoltam tudományos közleményben is (Urbányi et al., 2006).

A disszertációmban tárgyalt **két ragadozó halfaj, a harcsa és a süllő** sperma mélyhűtésének igénye a gyakorlat felől érkezett. Ezen halfajok keltetőházi szaporításának kidolgozottsága közel áll a tökéleteshez, de van egy-egy tényező, mely veszélyezteti a szaporító munka sikerességét. Ez pedig a hímivartermékek megfelelő időben való rendelkezésre állása. Harcsa esetében ezt elsősorban a hím egyedek előlésével biztosítják, míg süllő esetében, amennyiben a szaporodás szinkronizálása nem megfelelő, akkor a sperma limitáló tényezővé lép elő. A kidolgozott technológia mindkét faj esetében keltetőházi, vagyis nagyüzemi bevezetésen is túljutott, és a gyakorlati szakemberek is alkalmazzák a szaporítási tevékenységük segítésére és könnyítésére.

A harcsa esetében a módszer kidolgozott: 6%-os fruktóz és 10%-os metanol hűtőmedium, 1:1 hígítási arány, 3 cm vastagságú polisztirol kereten 7 perces hűtést követően olyan minőségű sperma áll rendelkezésre, mely a natív spermával megegyező kelési eredményeket biztosít. Ezen munkám eredményét közöltük tudományos folyóiratban (Bokor et al., 2010), illetve adaptáltuk más harcsafélékre (Kovács et al., 2010).

A süllő esetében a módszer kidolgozottsága majdnem közelít a tökéleteshez. Az optimális metodika még nem egyértelmű, további vizsgálatokat igényel az a tény, miszerint a termékenyülési és a kelési eredmények esetében a legjobb eredményt eltérő védőanyag alkalmazása eredményezi. A termékenyülési adatoknál a glükóz és 10%-os DMSO, míg kelési eredményeknél a glükóz és 10%-os metanol kombináció bizonyult a legmegfelelőbbnek. A többi kritikus paramétert meghatároztam: 1:1 hígítási arány, 3 cm vastag polisztirol keret alkalmazása mellett 3 perces mélyhűtési időtartam, felolvasztás 40 °C-os vízfürdőben 13 másodperc időtartam alatt. Eredményeimről beszámoltam (Bokor et al., 2008), a módszert más sügérféléknél is alkalmazzuk (Bokor et al., 2007).

A **kecsege** fajon végzett munkám eredményei még ezen halfaj spermamélyhűtési kutatásaink kezdetén születtek, viszont számos további, a tokféléken folytatott együttműködés és kísérleti munka alapjait képezi. A módosított Tsvetkova hígító kidolgozása, valamint a metanol, mint védőanyag bevezetése alapjaiban változtatta meg a tokfélék spermamélyhűtési módszertanát, melyet azóta is számos helyen alkalmaznak a világban. Ezen munka eredményeképpen számos publikáció született tudományos folyóiratban (Horváth et al., 2010, Horváth et al., 2008a), vagy könyvfejezetként (Horváth et al., 2008b).

A disszertációban bemutatott eredmények rendezőelve volt az **alkalmazhatóság**. A lépések és módszerek tervezésénél fontos volt azon kritérium figyelembevétele, hogy a kidolgozott metodika milyen mértékben vezethető be a gyakorlat számára.

A spermamélyhűtés technológiáját napjainkra több mint 200 halfajra kifejlesztették, de gyakorlati alkalmazásról szinte nincs információnk. A mélyhűtés gyakorlati felhasználása még gyerekcipőben jár, ellentétben a szarvasmarha ágazattal, ahol a mélyhűtött sperma felhasználása mindennapossá vált és önálló iparágga fejlődött. Ezért is tartottam fontosnak, hogy az eredményekből levont következtetések mellett fokozott figyelmet fordítsak a módszer praktikumba való bevezetésének analizálására, feltérképezsem és meghatározzam azokat a kritikus tényezőket és faktorokat, melyek az iparszerű alkalmazást gátolják. Így a disszertációmban külön fejezetben tárgyalom a **standardizálás** problémakörét, melyben elemeztem a mélyhűtés teljesítmény fokozásának szükséges kritériumait, elkülönítettem és definiáltam a metodikai és technológiai lépéseket, és SWOT analízis alkalmazásával prognosztizáltam a hal hímivarsejt-mélyhűtés fejlődés lehetőségeit és korlátait.

Bízom benne, hogy a módszer rövid időn belül teret nyer a haltenyésztésben és halgazdálkodásban, és olyan rutinszerű technológiává válik, mely elősegíti az akvakultúra ágazat fejlődését.

6. Irodalomjegyzék

1. **Alvarez, B., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Cabrera, E., Pimentel, E., Arenal, A. 2003:** High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. *Aquaculture* 195-201.
2. **Amann, P.R., Katz, F.D. 2004:** Reflections on CASA after 25 years. *Journal of Andrology* 25. (3) 317-325.
3. **Babiak, I., Glogowski, J., Luczynski, M.J., Kucharczyk, D. and Luczynski, M. 1995:** Cryopreservation of the milt of northern pike. *Journal of Fish Biology* 46:819-828.
4. **Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J. and Adamek, J. 1997:** Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 28, 567-571.
5. **Bacetti, B., Burrini, G., Callaini, G., Gibertini, G., Mazzini, M., Zerunion, S. 1984:** Fish germinal cells: Comparative spermatology of seven Cyprinid species. *Gamete Research*, 10, 373-396.
6. **Bart, A.N., Wolfe, D.F., Dunham, R.A. 1998:** Cryopreservation of Blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. *Transactions of the American Fisheries Society* 127. 819-824.
7. **Bartley, D. M., Pullin, R.S.V. 1999:** Aquatic genetic resources policy. Pages 1-16 in R.S.V.Pullin, D.M. Bartley and J. Kooiman (eds), Towards Policies for Conservation and Sustainable Use of Aquatic Genetic Resources. *ICLARM Conference Proceedings* 59, Manila.
8. **Bartley, D. M. 2005:** Status of the world's fishery genetic resources. *The Role of Biotechnology FAO Conference, Full Paper Book*, Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005.
9. **Basavaraja, N., Hedge, N.S., Akash, N., Udupa, S.K. 2002:** The fertility of cryopreserved deccan mahseer, *Tor khudree* (Sykes) spermatozoa. *Asian Fisheries Science* 15. 193-202.
10. **Bergeron, A., Vandenberg, G., Proulx, D., Bailey, L.J. 2002:** Comparison of extenders, dilution ratios and theophylline additions on the function of cryopreserved walleye semen. *Theriogenology* 57. 1061-1071.
11. **Billard, R. 1969:** Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelques poissons Téléostéens. *Quadreno*, 137, 71-79.
12. **Billard, R. 1972:** Racines flagellaires transitoires au cours de la spermiogenese de la truite. *Journal de microscopie*, pp. 14-21.

13. **Billard, R. 1978:** Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. *Actes de Colloques du Centre Nationale de l'Exploitation des Oceans (CNEXO)* 8, 59-73.
14. **Billard, R., Fostier N., Well C. and Breton B. 1982:** Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 65-79.
15. **Billard, R. 1983:** Spermiogenesis in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). An ultrastructural study, *Cell and Tissues Research*, 230 265-284.
16. **Billard, R. 1986:** Spermatogenesis and spermatology of some teleost species, *Reprod.Nutr.Develop.*, 26, 877-920.
17. **Billard, R. 1990:** Spermatogenesis in teleost fish. *Marshall's Physiology of Reproduction*, vol. 2. Reproduction in the male. vol. 2. 183-212.
18. **Billard, R., Cosson, J. & Linhart, O. 2000:** Changes in the flagellum morphology of intact and frozen/thawed Siberian sturgeon *Acipenser baeri* (Brandt) sperm during motility. *Aquaculture Research*, 31, 283-288.
19. **Blaxter, J.H.S. 1953:** Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172,1189-1190.
20. **Bokor, Z., Müller, T., Bercsényi, M., Horváth, L., Urbányi, B., Horváth, Á. 2007:** Cryopreservation of sperm of two European percid species, the pikeperch (*Sander lucioperca*) and the Volga pikeperch (*S. volgensis*). *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 58:(2) pp. 199-207.
21. **Bokor, Z., Horvath, A., Horvath, L., Urbanyi, B. 2008:** Cryopreservation of Pike Perch Sperm in Hatchery Conditions. *Israeli Journal of Aquaculture Bamidgeh* 60:(3) pp. 168-171.
22. **Bokor, Z. 2009:** A harcsa (*Silurus glanis*) és a süllő (*Sander lucioperca*) sperma mélyhűthetőségének vizsgálata gyakorlati szempontok alapján. *Doktori értekezés*, Szent István Egyetem, Gödöllő.
23. **Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, L., Horváth, Á. 2010:** Commercial-scale cryopreservation of wels catfish (*Silurus glanis*) semen. *Aquaculture Research*, Short Communication 41, 1549-1551.
24. **Breton, B., Horoszewicz, L., Billard, R., Bieniarz, K. 1980:** Temperature and reproduction in tench, effect of rise in the annual temperature regime and gonadotropin level gametogenesis and spawning. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 20, 105-118.
25. **Brown, G.B., Mims, S.D. 1999:** Cryopreservation of Paddlefish *Polyodon spathula* milt. *Journal of the World Aquaculture Society* 30 (2) 245-249.

- 26. Burtsev, I. A., Serebryakova, E. V. 1969:** First experiments of deep freezing of the sturgeon sperm. In: *Works of young scientists*. Szerk.: Vladimirskaya, E. V. VNIRO Moscow, 1: 99, 94-100.
- 27. Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R., Herráez, M.P. 2001:** Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. *Aquaculture* 201. 301-314.
- 28. Cabrita, E., Robles, V., Cunado, S. 2005:** Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* 50. (3) 273-284.
- 29. Caffey, R.H. and Tiersch, T.R. 2000:** Economics and Marketing of Cryopreserved Fish Sperm, In: *Cryopreservation in aquatic species*. Szerk: Tiersch T.R. és Mazik P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 388-408.
- 30. Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Filho, E.Z., Harvey, B.J. 2003:** Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* 63. 472-489.
- 31. CBD 1992:** Convention on Biological Diversity. *Secretariat of the Convention on Biological Diversity*, Montreal, Canada. Elérhetőség: <http://www.biodiv.org>.
- 32. Chambeyron, F., Zohar, Y. 1990:** A diluent for sperm cryopreservation of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Aquaculture* 90. 345-352.
- 33. Chen, S.L., Ji, X.S., Yu, G.C., Tian, Y.S., Sha, Z.X. 2004:** Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture* 236. 547-556.
- 34. Chereguini, O., de le Banda, I.G., Rasines, I., Fernandez, A. 2001:** Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. *Aquaculture Research* 32. 133-143
- 35. Chereguini, O., de le Banda, I.G., Rasines, I., Fernandez, A. 2002:** Growth and survival of young turbot produced with cryopreserved sperm. *Aquaculture Research* 33. 637-641.
- 36. Cherepanov, V.V., Drokin S.I., Ochkur S.I., Dzuba B.B., Chikhachov A.S., Kopeika, E.F. 1993:** Freezing of sperm of the Azov-Black Sea Acipenserids. *International Symposium on Sturgeons*, Sept. 6-11, Moscow-Kostroma-Moscow, Abstract Bulletin p. 63.
- 37. Cherr, G.N., Clark, W.H. 1984:** An acrosome reaction in sperm from the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. *The Journal of Experimental Zoology*, 232, 129-139.
- 38. Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. 1996:** Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* 27:340-346.

- 39. Christensen, J.M., Tiersch, T.R. 1997:** Cryopreservation of Channel catfish spermatozoa: effect of cryoprotectant, straw size, and formulation of extender. *Theriogenology* 47. 639-645.
- 40. Christensen, J.M., Tiersch, T.R. 2005:** Cryopreservation of Channel catfish sperm: effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing conditions, and male-to-male variation. *Theriogenology* 63. 2103-2112.
- 41. Ciereszko, A., Ramseyer, L., Dabrowski, K. 1993:** Cryopreservation of yellow perch semen. *Progressive Fish-Culturist*. 55:261-264.
- 42. Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. 2000:** Biochemical Characteristics of Seminal Plasma and Spermatozoa of Freshwater Fishes. In: *Cryopreservation in aquatic species*. Szerk: Tiersch T.R. és Mazik P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 20-48.
- 43. Cognie, F., Billard, R., & Chao, N.H. 1989:** La cryoconservation de la laitance de la carpe, *Cyprinus carpio*. *Journal of Applied Ichthyology* 5, 165-176.
- 44. Denniston, R.S., Michelet, S. and Godke, R.A. 2000:** Principles of Cryopreservation. In: *Cryopreservation in Aquatic Species*, Szerk: Tiersch T.R. és Mazik P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA. pp 59-74.
- 45. Dong, Q., Huang, C., Tiersch, T.R. 2007:** Control of sperm concentration is necessary for standardization of sperm cryopreservation in aquatic species: Evidence from sperm agglutination in oysters. *Cryobiology, Volume 54, Issue 1, Pages 87-98*.
- 46. Drokin, S.I., Zabelinski, S.A. and Kopeika, E.F. 1985:** The effect of cryopreservation on phospholipids and their fatty acids from the sperm of the grass carp *Ctenopharyngodon idella*. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimi Biofizologii* 21, 79-82.
- 47. Drokin, S.I., Cserepanov V.V., Kopejka E.F. & Silin N.I. 1991:** Сахалинский осётр: как сохранить генофонд. *Рыбное хозяйство*. 7, 38-39.
- 48. Dunham, R.A., Smitherman, R.O. 1987:** Genetics of breeding catfish. *Alabama Agricultural Experiment Station. Regional Research Bulletin 325, Southern Cooperative Series*, Auburn University, Alabama.
- 49. Durbin, H., Durbin, F.J. and Stott, B. 1982:** A note on the cryopreservation of grass carp milt. *Fisheries Management*, 13, 115-117.
- 50. Erdahl A.W. 1986:** Factors affecting storage and fertilization of fish gametes *Ph.D. thesis, University of Minnesota*, St. Paul, Minnesota, 1-128.
- 51. Eschaffre, A.M. et Billard, R. 1976:** Le cycle spermatogénétique du gardon *Rutilus rutilus*. *Cahiers du laboratoire de Montereau*, 3, 43-46.

- 52. Fabbrocini, A., Lavadera, L.S., Rispoli, S., Sansone, G. 2000:** Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. *Cryobiology* 40. 46-53.
- 53. Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A. and Meryman, H.T. 1984:** Vitrification as an Approach to Cryopreservation, *Cryobiology* 21, 407-426.
- 54. Fahy, G.M. 1986:** The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology. *Cryobiology* 23, 1-13.
- 55. Flajšhans, M., Cosson, J., Rodina, M., Linhart, O. 2004:** The application of image cytometry to viability assessment in dual fluorescence-stained fish spermatozoa. *Cell Biology International* 28. 955-959.
- 56. Gallis, J. L., Fedrigo, E., Jatteau, P., Bonpunt, E., Billard, R. 1991:** Siberian sturgeon, *Acipenser baeri*, spermatozoa: effects of dilution, ph, osmotic pressure, sodium and potassium ions on motility. In: Williot P. (ed.), *Acipenser. CEMAGREF Publ.* pp. 143-151
- 57. Glogowski, J., Babiak, I., Luczynski, M.J. and Luczynski, M. 1997:** Factors affecting cryopreservation efficiency and enzyme activity in Northern pike, *Esox lucius*, sperm. *Journal of Applied Aquaculture* 7:53-67.
- 58. Glogowski, J., Ciereszko, A., Dabrowski, K. 1999a:** Cryopreservation of muskellunge and yellow perch semen. *North American Journal of Aquaculture* 61:258-262.
- 59. Glogowski, J., Babiak, I., Kucharczyk, D., Luczynski, M. & Piros, B. 1999b:** Some proerties of bream *Abramis brama* L. sperm and its cryopreservation. *Aquaculture Research* 30: 765-772.
- 60. Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski, M., Horváth, Á., Urbányi, B., Sieczyński, P. 2002:** Rzemieniecki, A., Domagała, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., and Ciereszko, A. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture* 211, 367–373.
- 61. Godinho, H.P., Amorim, V.M.D.C., Peixoto, M.T.D. 2003:** Cryopreservation of the semen of Nile tilapia *Oreochromus niloticus* var. *Chitralada*: Cryoprotectans, spermatozoa activating solution and cryogenic refrigerator. *Revista Brasileira de Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science* 32. (6) 1537-1543.
- 62. Guest, W.C., Avault, Jr J.W. & Roussel, J.D. 1976:** Preservation of channel catfish sperm. *Transactions of the American Fisheries Society* 3, 469-474.
- 63. Hagedorn, M. and Kleinhans, F.W. 2000:** Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. In: *Cryopresertvation in aquatic species*. Szerk: Tiersch, T.R. és Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA Pp. 161-178.

- 64. Harvey, B. 1983:** Cryopreservation of *Sharoterodon mossambicus* spermatozoa, *Aquaculture* 32, 313–320.
- 65. Hayes, C.M., Rubin, P.S., Hensleigh, E.J., Reisenbichler, R.R., Wetzel, A.L. 2005:** Performance of juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) produced from untreated and cryopreserved milt. *Aquaculture* 249. 291-302.
- 66. Helfman, G. S. (szerkesztő) 2007:** Fish Conservation: A Guide to Understanding and Restoring Global Aquatic Biodiversity and Fishery Resources. 1-584 pp, *Island Press*.
- 67. Hiemstra, S. J., van der Lende, T. és Woelders, H. 2005:** The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. *The Role of Biotechnology FAO Conference, Full Paper Book*, Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005.
- 68. Hill, D. (szerkesztő) 2005:** Handbook of Biodiversity Methods. 1-558 pp., *Cambridge University Press*.
- 69. Honeyfield, D.C., Krise, W.F. 2000:** Measurement of milt quality and factors affecting viability of fish spermatozoa. In: *Cryopreservation in aquatic species*. Szerk: Tiersch T.R. és Mazik P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 49-58.
- 70. Horváth, Á., Urbányi, B. 2000:** The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) sperm. *Aquaculture Research*, 31/3 317-324
- 71. Horváth, Á., Urbányi, B. 2001:** Cryopreservation of sperm of some European cyprinids and percids. *World Aquaculture* 32. (4) 23-25.
- 72. Horváth, Á. 2001:** Halgaméták mélyhűtési módszereinek továbbfejlesztése. *Doktori értekezés*, Szent István Egyetem, Gödöllő.
- 73. Horváth, Á., Miskolczi, E. and Urbányi, B. 2003:** Cryopreservation of common carp sperm. *Aquatic Living Resources* 16: pp. 457-460.
- 74. Horváth, Á., Wayman, W.R., Urbányi, B., Ware, K.M., Dean, J.C., and Tiersch, T.R. 2005:** The relationship of the cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. *Aquaculture* 247, 243–251.
- 75. Horváth, Á., Urbányi, B., Mims, S.D., Bean, W.B., Gomelsky, B., and Tiersch, T.R., 2006:** Improved cryopreservation of sperm of paddlefish (*Polyodon spathula*). *Journal of the World Aquaculture Society* 37, 4, 356–362.
- 76. Horváth, Á. 2007:** Cryobank of common carp sperm, a tool for the preservation of genetic resources. Workshop a ponty (*Cyprinus carpio*) genetikai erőforrásainak jellemzése és megőrzése. (előadás) *HAKI, Szarvas*, december.

- 77. Horváth, Á., Miskolczi, E., Mihálffy, SZ., Ősz, K., Szabó, K., Urbányi, B. 2007:** Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm in 1,2 and 5 ml straws and occurrence of haploids among larvae produced with cryopreserved sperm. *Cryobiology* 54. 251-257.
- 78. Horváth, Á., Wayman, R., Dean, J.C., Urbányi, B., Tiersch, T.R., Mims, S.D., Johnson, D., Jenkins, J.A. 2008a:** Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study. *Journal of Applied Ichthyology*, 24, 443-449.
- 79. Horváth, Á., Urbányi, B., Mims, S.D. 2008b:** Cryopreservation of sperm from species of the order Acipenseriformes. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (szerk.): *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton: Taylor and Francis, pp. 409-414.
- 80. Horváth, Á., Urbányi, B., Wang, C., Onders, R.J., Mims, S.D. 2010:** Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *Journal of Applied Ichthyology* 26: pp. 715-719.
- 81. H. Tamás, G., Horváth, L. és Tölg, I. 1982:** Tógazdasági tenyészanyag-termelés. 245-248. *Mezőgazdasági Kiadó*, Budapest.
- 82. Jähnichen, H., Warnecke, D., Trölsch, E., Kohlmann, K., Bergler, H., Pluta, H.-J. 1997:** Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm. 3rd *International Sturgeon Symposium*, Abstract.
- 83. Jähnichen, H., Warnecke, D., Trölsch, E., Kohlmann, K., Bergler, H. & Pluta, H.-J. 1999:** Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm. *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 204-206.
- 84. Jenkins, J.A. 2000:** Infectious Disease and Quality Assurance Considerations for the Transfer of Cryopreserved Fish Gametes. In: *Cryopreservation in aquatic species*. Szerk: Tiersch T.R. és Mazik P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, 343-363.
- 85. Kasimov, R.Y., Dzahafarov, A.I., Periligin, V.V., Gasanov, G.I., Rustamova, S.A. 1974:** Influence of deep freezing of the sperm of *Acipenser gueldenstaedti* and *A. stellatus* on their resistance and fertilizing capacity. In: *Materials of the accounting session of TsNIORKh Astrakhan*. Szerk.: Astakhova, T.V. pp 60-61.
- 86. Katassonov, V.J., Tsvetkova, L.I., Titareva, L.N., Kochetov, A.A. and Milenko, V.A. 1995:** Genetic cryobank: a genetic collection of cryopreserved fish sperm. (abstract). *Aquaculture*, 129: 216.
- 87. Kerby, H.J., Bayless, D.J., Harrel, M.R. 1985:** Growth, survival, and harvest of striped bass produced with cryopreserved spermatozoa. *Transactions of the American Fisheries Society* 114. 761-765.

88. Keresztessy, K., Horváth, L., Urbányi, B., Horváth, Á., Baska, F., Pethő, Á., Masek, P. 2003: Veszélyeztetett tiszai halfajok megőrzési lehetőségei. *Hidrológiai Közöny.* 83, 73-75.
89. Kime, E.D., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H.D.M., Ollevier, F. 1996: Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicology* 36. 223-237.
90. Kime, E.D., Van Look, W.J.K., McAllister, G.B., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F. 2001: Computer-assisted sperm analysis (CASA) as tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.* 130. 425-433.
91. Koldras, M and Bieniarz, K. 1987: Cryopreservation of carp sperm. *Polskie Archiwum Hydrobiologii.* 34, 125-134.
92. Kovács, É., Müller, T., Márián, T., Krasznai, Z., Urbányi, B., Horváth, Á. 2010: Quality of cryopreserved African catfish sperm following post-thaw storage. *Journal of Applied Ichthyology*, 26: pp. 737-741.
93. Krasznai, Z. és Márián, T. 1985: Kísérletek a lesőharcsa (*Silurus glanis* L.) spermájának mélyhűtéses tartósítására és az évszaktól független szaporításra. *Halászat* 31, 25-28.
94. Kumar, K. 1988: A comparative study of various extenders for cryopreservation of carp spermatozoa. *Indian Journal of Animal Science* 58: 1355-1360.
95. Kurokura, H. and Hirano, R. 1980: Cryopreservation of Rainbow trout sperm. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 46, 1493-1495.
96. Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M. & Iwahashi, M. 1984: Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture*, 37, 267-273.
97. Kwantong, S., Bart, A.N. 2003: Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. *Aquaculture Research* 34, 887-893.
98. Kwantong, S., Bart, A.N. 2006: Cryopreservation of black ear catfish, *Pangasius larnaudii*, (Bocourt) sperm. *Aquaculture Research* 37, 955-957.
99. Labbe, C., Martoriati, A., Devaux, A., Maisse, G. 2001: Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. *Molecular Reproduction and Development* 60. 397-404.
100. Lahnsteiner, F., Weismann, T. & Patzner R.A. 1995: A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta f. fario* L., *Salmo trutta f. lacustris* L., *Coregonus* sp. *Aquaculture Research*, 26, 801-807.

- 101. Lahnsteiner F., Weismann T. & Patzner R.A. 1997:** Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research* 28, 471-479.
- 102. Lahnsteiner, F., Berger, B., Horváth, Á., Urbányi, B., Weismann, T. 2000:** Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. *Theriogenology* 54. 1477-1498.
- 103. Lahnsteiner, F., Mansour, N., Weismann, T. 2002:** A new technique for insemination of large egg batches with cryopreserved semen in the rainbow trout. *Aquaculture* 209. 359-367.
- 104. Lahnsteiner, F. 2002:** Személyes közlés, *Osztrák Magyar Akcióalapítvány pályázati projekt megvalósítása során.*
- 105. Lanes, C.F.C., Okamoto, M., Cavalcanti, V.P., Collares, T., Campos, F.V., Deschamps, C.J., Robaldo, B.R., Marins, F.L., Sampaio, A.L. 2008:** Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. *Aquaculture* 275. 361-365.
- 106. Lang, R.P., Riley, K.L., Chandler, J.E., Tiersch, T.R. 2003:** The use of dairy protocols for sperm cryopreservation of Blue catfish *Ictalurus furcatus*. *Journal of the World Aquaculture Society* 34. (1) 66-75.
- 107. Legendre, M., Linhart, O. and Billard, R. 1996:** Spawning and management of gametes, fertilized eggs and embryos in Siluroidei. In: *The biology and culture of catfishes*. (szerk. M. Legendre & J.P. Proteau) *Aquatic Living Resources* 9, Hors série, 59-80.
- 108. Leibo, S.P. 1980:** Water Permeability and its Activation Energy of Fertilized and Unfertilized Mouse Ova. *Journal of Membrane Biology* 53, 179-188.
- 109. Leung, L.K.P. 1987:** Cryopreservation of the spermatozoa of Barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). *Aquaculture* 64, 243-247.
- 110. Leung, L.K.P. 1991:** Principles of biological cryopreservation. In: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Szerk: Jamieson B. G. M. and Leung L. K. P. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- 111. Lin, C.S., Xianting, I., Dachun, L., Longzhen, Z., Caojin, F., Jiangping, F., Feng, G. and Wentao, D. 1992:** Cryopreservation of Chinese carps spermatozoa and fertilization success. *Workshop on Gamete and Embryo Storage and Cryopreservation in Aquatic Organisms*, Marly le Roy, France. abstract.
- 112. Linhart, O., Billard, R. and Proteau, J.P. 1993:** Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. *Aquaculture* 115, 347-359.
- 113. Linhart, O., Rodina, M. & Cosson, J. 2000:** Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of Embryos. *Cryobiology* 41: 241-250.

- 114. Linhart, O., Gela, D., Rodina, M., Kocour, M. 2003:** Optimization of artificial propagation in European catfish, *Silurus glanis* L. *Aquaculture* 235, p. 619-632
- 115. Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D., Kocour, M. 2005:** Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability and hatching success of embryos. *Cryobiology* 51, 250-261.
- 116. Linhart, O., Alavi, H.S.M., Rodina, M., Policar, T., Psenicka, M., Rougeot, C. 2008:** Sperm quality and cryopreservation in *Perca fluviatilis*. 23-27. p. In: Fontaine, P., Kestemont, P., Teletchea, F., Wang, N. (Szerk.): *Percid Fish Culture, From Research to Production*. Namur: Presses Universitaires De Namur.
- 117. Litkei, J. 1976:** A halak mesterséges termékenyítésének további fejlesztési lehetőségei. *Diplomamunka, Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Mezőgazdaságtudományi Kar*, 1-41. oldal.
- 118. Liu, Q.H., Li, J., Zhang, S.C., Xiao, Z.Z., Ding, F.H., Yu, D.D., Xu, X.Z. 2007:** Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology* 67. 1168-1174.
- 119. Lubzens, E., Rothbard, S. and Hadani, A. 1993:** Cryopreservation and viability of spermatozoa from the ornamental japanese carp (nishikigoi). *Bamidgeh*, 45, 4, 169-174.
- 120. Lubzens, E., Daube, N., Pekarsky, I., Magnus, Y., Cohen, A., Yusefovich, F., Feigin, P. 1997:** Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks – strategies in research and application. *Aquaculture* 155. 13-30.
- 121. Magyary, I., Urbányi, B. and Horváth, L. 1996a:** Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm I. The importance of oxygen supply. *Journal of Applied Ichthyology* 12, 113-115.
- 122. Magyary, I., Urbányi, B. and Horváth, L. 1996b:** Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization. *Journal of Applied Ichthyology* 12, 117-119.
- 123. Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F., Oliveira, A.V. 2006:** Extenders and cryoprotectants for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture* 260. 298-306.
- 124. Mattei, X. 1991:** Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes, *Canadian Journal of Zoology*, 69, 3038-3055
- 125. Mazur, P. 1963:** Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *Journal of Cell Physiology* 47, 347-369.
- 126. Mazur, P. 1970:** Cryobiology: The Freezing of Biological Systems, *Science*, Vol. 168, 939-949.

- 127. Mims, S.D., Tsvetkova, L.I., Brown, G.G. and Gomelsky B.I. 2000:** Cryopreservation of sperm of sturgeon and paddlefish. In: *Cryopresertvation in aquatic species*. Szerk: Tiersch, T.R. és Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp.123-129.
- 128. Miskolczi, E., Mihálffy, SZ., Várkonyi, E.P., Urbányi, B., Horváth, Á. 2005:** Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. *Aquaculture* 247. 119-125
- 129. Moczarski, M. 1977:** Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. *Bulletin De La Académie Polonaise Des Sciences, Serie des sciences biologiques*, 24, 187-190.
- 130. Mongkonpunya, K., Pupipat, T., Tiersch, T.R. 2000:** Cryopreservation for sperm of the Mekong giant catfish. In: Tiersh, T.R., Mazik, P.M. (Szerk): *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana 290-291.
- 131. Moore, A.A. 1987:** Short-term storage and cryopreservation of walleye semen. *Progressive Fish-Culturist* 49. 40-43.
- 132. Morisawa, M., Suzuki, K. 1980:** Osmolality and potassium ions: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210, 1145-1147.
- 133. Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., Yasuda, K. 1983:** Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes, *Journal of Experimental Biology*, 107, 95-103.
- 134. Morisawa, M., Tanimoto, S., Ohtake, H. 1992:** Characterization and partial purification of sperm-activating substance from eggs of the herring, *Clupea pallasii*. *Journal of Experimental Zoology*, 264, 225-230.
- 135. Muchlisin, Z.A., Hashim, R., Chong, A.S.C. 2004:** Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology* 62. 25-34.
- 136. Ogier de Baulny, B., Le Vern, Y., Kerboeuf, D. and Maisse, G. 1997:** Flow cytometric evaluation of mitochondrial activity and membrane integrity in fresh and cryopreserved rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) spermatozoa. *Cryobiology*, 34, 141-149.
- 137. Ogier de Baulny, B., Maisse, G., Labbé, C. 2008:** Cryopreservation of testicular sperm from European catfish (*Silurus glanis*). In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, P. (Szerk): *Methods in Reproductive Aquaculture, Marine and Freshwater Species*. CRC Press, Taylor&Francis Group, Boca Raton, FL. 397-401.
- 138. Otémé, Z.J., Nunez-Rodriguez, J., Kouassi, C.K., Hem, S. & Agnese, J.-F. 1996:** Testicular structure, spermatogenesis and sperm cryopreservation in the

African clariid catfish *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840) *Aquaculture Research* 27, 805-813.

139. Padhi, B.K. and Mandal, R.K. 1995: Cryopreservation of spermatozoa of two Asian freshwater catfishes, *Heteropneustes fossilis* and *Clarias batrachus*. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 10, 23-28.

140. Pan, J., Ding, S., Ge, J., Yan, W., Hao, C., Chen, J., Huang, Y. 2008: Development of Cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. *Aquaculture* 279. 173-176.

141. Parmentier, H.K., Timmermans, L.P.M. 1985: The differentiation of germ cells and gonads during development of carp (*Cyprinus carpio* L.). A study with anticarp sperm monoclonal antibodies. *Journal of Embryol. Exp. Morph.*, 90, 13-32

142. Perchec, G., Cosson, J., André, F., Billard, R. 1995: Degradation of the quality of carp sperm by urine contamination during stripping. *Aquaculture* 129. 135-136.

143. Polge, C., Smith, A.U., Parkers, A.S. 1949: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164, 666.

144. Psenicka, M., Dietrich, G.J., Wojtczak, M., Nynca, J., Rodina, M., Linhart, O., Cosson, J., Ciereszko, A. 2008: Acrosome staining and motility characteristics of sterlet spermatozoa after cryopreservation with use of methanol and DMSO. *Cryobiology*, 56, 251-253.

145. Pushkar, N. S., Itkin, Yu. A., Kopeika, E. F., Gordienko, E. A., Bronshtein, V.L., Glushko, T. A. 1978: A method of conservation of fish sperm. *Ofits Byull Gos Komiteta Soveta Ministrov SSSR po Delam Izobretenii i Otkrytii* 5:3.

146. Rana, K.J., McAndrew, B.J. 1989: The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture* 76 (3-4) 335-345.

147. Rana, K.J. 1995: Preservation of Gametes. In: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Szerk.) *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Stirling, *Blackwell Science*, pp. 53-75.

148. Rideout, R.M., Litvak, M.K., Trippel, E.A. 2003: The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research* 34. 653-659.

149. Roosen-Runge, E.C. 1977: The process of spermatogenesis in animals. *Cambridge Univ. Press*, Cambridge.

150. Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980: A review of biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17, 707-739.

- 151. Silveira-Ninhaus, A., Foresti, F., Silveira-Veríssimo, R., Senhorini, J.A. 2006:** Seminal Analysis, Cryogenic Preservation, and Fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49. (4) 651-659.
- 152. Simianer, H. 2005:** Use of molecular markers and other information for sampling germplasm to create an animal genebank. *The Role of Biotechnology FAO Conference, Full Paper Book*, Villa Gualino, Turin, Italy – 5-7 March, 2005.
- 153. Smith, A.U., Polge, C. 1950:** Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Veterinary Record* 62, 115-116.
- 154. Sneed, K. E., Clemens, H.P. 1956:** Survival of fish sperm. After freezing and storage at low temperature. *The Prog. Fish. Cult.* 18/99-103.
- 155. Steyn, G.J., Van Vuren, J.H.J., Schoonbee, H.J. and Chao, N.H. 1985:** Preliminary investigations on the cryopreservation of *Clarias gariepinus* (Clariidae: pisces) sperm. *Water SA* 11, 1, 15-18.
- 156. Steyn, G.J. and Van Vuren, J.H.J. 1987:** The fertilizing capacity of cryopreserved Sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. *Aquaculture* 63, 187-193.
- 157. Steyn, G.J. 1993:** The effect of freezing rate on the survival of cryopreserved African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa. *Cryobiology*, 1993. 30, 581-590.
- 158. Stewart, D.L. 1951:** Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Veterinary Record* 63, 56.
- 159. Stoss, J. and Holtz, W. 1981:** Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm. I. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. *Aquaculture*, 22, 97-104.
- 160. Stoss, J. and Holz, W. 1983:** Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture* 31, 269-274.
- 161. Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes H.M., Billard, R. 1998:** Long-term effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquatic living resources* 11. 45-48.
- 162. Svéda, M. 1973:** A halak hímivarsejtjeinek tárolási próbái. *Halászat*, 6, 183. oldal.
- 163. Szabó, T. 2000:** A csuka tógazdasági tenyésztése In. Horváth, L. (Szerk): *Halbiológia és haltenyésztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 312.
- 164. Szász, F. 2007:** Az ondó vizsgálata. pp. 95-103.. In: Pécsi, T. (Szerk): *Házi emlőssálatok mesterséges termékenyítése*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 412.

- 165. Tiersch, T.R., Goudie, C.A. & Carmichael, G.J. 1994:** Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Transactions of the American Fisheries Society* 123, 580-586.
- 166. Tiersch, T.R. 2000:** Preface. In: *Cryopreservation in aquatic species*. Szerk: Tiersch T.R. és Mazik P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp.XV-XVI.
- 167. Tiersch, TR, Yang, H, Jenkins, JA, Dong, Q. 2007:** Sperm cryopreservation in fish and shellfish. In: Roldan, E.R.S., Gomendio, M. (Ed.). *Spermatology, Society of Reproduction and Fertility* Supplement 65, Nottingham University Press, Nottingham, p.493-508.
- 168. Tiersch, T.R. 2011:** Preface. In: *Cryopreservation in aquatic species*. Szerk: Tiersch T.R. és Green C.C. World Aquaculture Society, Baton Rouge, USA, pp.9-15.
- 169. Toth, G.P., Ciereszko, A., Christ, S.A., Dabrowski, K. 1997:** Objective analysis of sperm motility in the lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions. *Aquaculture* 154. 337-348.
- 170. Tsvetkova, L.I., Cosson, J., Linhart, O. & Billard, R. 1996:** Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 12, 107-112.
- 171. U.S. Census Bureau 2009:** International Database, December 2009. *update information*.
- 172. Urbányi, B., Horváth, Á., Billard, R., Fierville, F. és Horváth, L. 1998:** Módszer tokfélék spermájának mélyhűtésére. *Halászati Tudományos Tanácskozás*, Szarvas, 1998. máj. 24-25. Előadás.
- 173. Urbányi, B., Horváth, Á., Varga, Zs., Horváth, L., Magyary, I., Radics, F. 1999:** Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Aquaculture Research* 30:(2) pp. 145-151.
- 174. Urbányi, B., Dinnyés, A. and Magyary, I. 2000:** Cryopreservation method for sperm of the sharptooth catfish. In: Tiersch, T. and Mazik, P. (Editors), *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 286-288.
- 175. Urbányi, B., Horváth, Á., Orbán, L., Jeney, Zs., Bercsényi, M., Magyary, I., Váradi, L. és Horváth, L. 2004:** A genetikai és molekuláris biológiai kutatásokban rejlő lehetőségek és hasznosításuk a halgazdálkodásban *MTA Halászati nap*, Budapest, szóbeli előadás.
- 176. Urbányi, B., Szabó, T., Miskolczi, E., Mihálffy, S., Vranovics, K. and Horváth, Á. 2006:** Successful fertilization and hatching of four European cyprinid

species using cryopreserved sperm. *Journal Of Applied Ichthyology*, 22: pp. 201-204.

177. Urbányi, B, Horváth, Á. 2008: Cryopreservation of common carp sperm. In: Cabrita E, Robles V, Herráez P (szerk.), *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*. Boca Raton: Taylor and Francis, pp. 351-356.

178. Van der Walt L.D., Van der Bank F.H., Steyn G.J. 1993: The suitability of using cryopreservation of spermatozoa for the conservation of genetic diversity in African catfish (*Clarias gariepinus*). *Comparative biochemistry and physiology. Part A: Comparative physiology*. 106. 313-318.

179. Viveiros A.T.M., So N., Komen J. 2000: Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. *Theriogenology* 54. 1395-1408.

180. Warnecke, D. & Pluta, H. J. 2003: Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. *Aquaculture* 215: 167-185.

181. Wayman W.R. and Tiersch T.R. 2000: Research methods for cryopreservation of sperm. In: *Cryopreservation in aquatic species*. Szerk: Tiersch T.R. és Mazik, P.M. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA pp. 264-275.

182. Wheeler, P.A., Thorgaard, G.H. 1991: Cryopreservation of rainbow trout semen in large straws. *Aquaculture*, 93, 95-100.

183. Withler, F.C. 1982: Cryopreservation of Spermatozoa of Some Freshwater Fishes Cultured in South and Southeast Asia. *Aquaculture*, 26, 395-398.

184. Yang, H., Jones, C., Varga, M.Z., Tiersch, T.R. 2007: Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology*, 68(2): 128-136.

185. Zhang, X. & Yun, L. 1991: Study on the cryopreservation of fish spermatozoa. *Acta Sci. Nat. Univ. Norm. Hunan* 14: 255-259 (in Chinese with English abstract).

186. Zhang, X. and Yun, L. 1992: Study on cryopreservation of fish spermatozoa II. Methods of freezing and Thawing. *Acta Sci. Nat. Univ. Norm. Hunan*. 15, 59-63 (in Chinese with English abstract).

187. Zhukhinsky, V.N. 1981: Impact of abiotic factors on the diversity and viability of fish in early ontogenesis. *Agropromizdat*. Moscow. 243 p.

Internet források:

188. <http://fish-gametes2011.org>

189. <http://tankonyvtar.hu>

7. Köszönetnyilvánítás

Nehéz próbálkozás, de igyekszem ezúton is köszönetet mondani mindenkinek, aki hozzájárult kutatási munkám kivitelezéséhez és a dolgozatom elkészítéséhez. Sajnos nem áll módomban mindenkit név szerint megemlíteni, így a következőkben a legfontosabb személyeket, partnereket emelném ki.

Köszönettel tartozom a **SZIE, MKK-KTI Halgazdálkodási Tanszék dolgozó kollektívájának**, akik a szorgos hétköznapiak gyakorta feszített és nehéz perceiben is mögöttem álltak, kitartottak és bíztattak. Külön köszönet a hölgyeknek: **Makádiné Farkas Anasztáziának, Farkasné Borbély Andreának, Pilcsik Tündének és Kovács Évának**, akik a sok adminisztrációs terhet részben átvállalták, és segítették munkámat.

Köszönetet szeretnék mondani korábbi és jelenlegi dékánjaimnak: **dr. Dimény Judit** professzor asszonynak és **dr. Csányi Sándor** professzor úrnak, akik bátorítottak és lehetőségeikhez mérten támogattak disszertációm összeállításában.

Hálával tartozom azon vállalkozásoknak, intézményeknek és gyakorlati szakembereknek, akik időt, energiát, infrastruktúrát és alapanyagot (ivarterméket) bocsátottak a rendelkezésemre, és lehetőséget adtak a mélyhűtési módszerek gyakorlati, keltetőházi tesztelésére, továbbá türelmet tanúsítottak a kutatásaim közben:

Csoma Gábor - Fish-Coop Kft.

Dankó István - Aranykárász Bt.

dr. Bercsényi Miklós - Pannon Egyetem Georgikon Mezőgazdasági Kar, Állattudományi és Állattenyésztési Tanszék, Állattan és Akvakultúra Csoport

Faidt Petra - Attala Hal Kft.

Finta Pál Erol - Böcsi Önkormányzat Körömi Haltelep

H-né. dr. Tamás Gizella - Attala Hal Kft.

Ittész István – Temperáltvízű Halszaporító Gazdaság

dr. Jeney Zsigmond – Halászati és Öntözési Kutatóintézet

Lévai Ferenc Aranypony Zrt.

Lódi György - Szegedfish Kft.

Németh Ferenc – Balatoni Halászati Zrt.

Orbán Kornél - Attala Hal Kft.

Radics Ferenc - Szarvasfish Kft.

Szabó Krisztián – MAHAL Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdaság

Szilágyi István – Közép-dunai Halászati Kft.

A halászati ágazaton belül kiemelném **Czikk László** tulajdonos urat (Czikkhalas Halastavai Kft.), **Radics Ferenc és Radicsné Ráczkevi Judit** tulajdonos kollégákat (Szarvasfish Kft.) és **Radóczy János** ügyvezető urat (Szabolcsi Halászati Kft.), akik a szakmaiság mellett barátságukkal is megtiszteltek, és hozzájuk szinte bárminemű kéréssel és gondommal nyugodtan fordulhattam.

Köszönöm **TDK, szakdolgozat- és diplomaterves és PhD hallgatóimnak** a munkájukat, melyek során a mélyhűtés egyes kisebb-nagyobb részleteiben segítettek munkámat, és igyekeztek elmélyedni ennek a szép technikának a rejtelmeiben.

Köszönetet mondok **dr. Magyary István** barátomnak, aki 1992-ben felkarolt, és türelmét – idejét nem sajnálva vezetett be az ivarsejt mélyhűtés rejtelseibe, és varázslatos világába.

Köszönettel tartozom **dr. Mézes Miklós** professzor úrnak, aki önzetlen tanácsaival formálta és egyengette a disszertációm, és felvetéseivel terelt a legjobb megoldások irányába.

Csak a hála szavaival illethetem **dr. Horváth László** professzor urat, Tanár urat, aki alapvetően határozta meg a sorsomat, a személye miatt választottam a Gödöllői Agrártudományi Egyetemet, aki mellett az évtizedek alatt sok szakmai és emberi értéket tanultam meg, és olyan iskolát adott, mely csak keveseknek adódhat.

Köszönetet szeretnék mondani **két közvetlen kollégámnak:**

dr. Horváth Ákos kollégámnak, barátomnak, akivel a „hőskorban”, a ’90-es évek elején együtt kezdtük el a mélyhűtési tanulmányainkat, szakdolgoztunk a Tanszéken, segítettük és támogattuk egymást, mely kapcsolat azóta is kiválóan működik. Akivel közel 20 éve ismerjük egymást, respektáljuk a másik habitusát, és akire mind a munka, mind a munkán kívüli közegben minden időben számítani lehet.

dr. Bokor Zoltán kollégámnak, barátomnak, akivel az elmúlt közel 10 évben dolgozunk együtt, szorgalmával és kitartásával nagyban hozzájárult mind a saját, személyes, mind a tanszéki sikereim eléréséhez, olyan társsá nőtte ki magát, akire mindig, mindenhol számítani lehet. Nagy segítséget nyújtott ezen disszertáció összeállítási és szerkesztési munkálatai során. Emellett a magánéletben is gyakorta boldogítjuk egymást, ha máshol nem, akkor a foci pályák környékén mulatjuk együtt szabadidőnket.

Csak a szeretet és hála szavait tudom „rebegni” Szüleimnek, **Édesapámnak, Urbányi Bélának** (RIP), aki gyerekfejjel, minden erőltetés nélkül mutatta meg nekem a halak és a halászat varázslatos világát, akinek köszönhetem azt, hogy ennek a csodálatos szakmának a rabjává váltam; **Édesanyámnak, Szabó Erzsébetnek**, aki az anyai szeretet minden pozitív érzésével és érzelmével mai napig ellát, óv, félt és szeret.

Köszönet **Nővéremnek, Kovácsné Urbányi Kamillának** az önzetlen és igaz testvéri szeretetért, **Keresztszüleimnek** - Perkovits Gézáné (Urbányi Katalin) és Perkovits Géza - a szeretetért, bölcs tanácsokért, **Apósomnak és Anyósomnak** - Rákóczi Ferenc és Rákóczi Ferencné (Spindler Mária) - a törődésért és a számtalan segítségért.

Köszönet **lányaimnak**, a három Hercegnőnek: **Sárinak, Kingusnak és Julcsinak**, hogy a fáradt hétköznapi és hétvégék során felüdülést és vidámságot hoztak a mindennapokban, akikért érdemes sokat dolgozni.

Rákóczi Katalinnak feleségemnek, társamnak nem tudom elégszer megköszönni azt, amit kaptam Tőle: nem jutottam volna el idáig, ha Ő nem áll mögöttem szeretetével, kitartásával, energiájával és hitével. Kati: örök hála és köszönet mindenért!